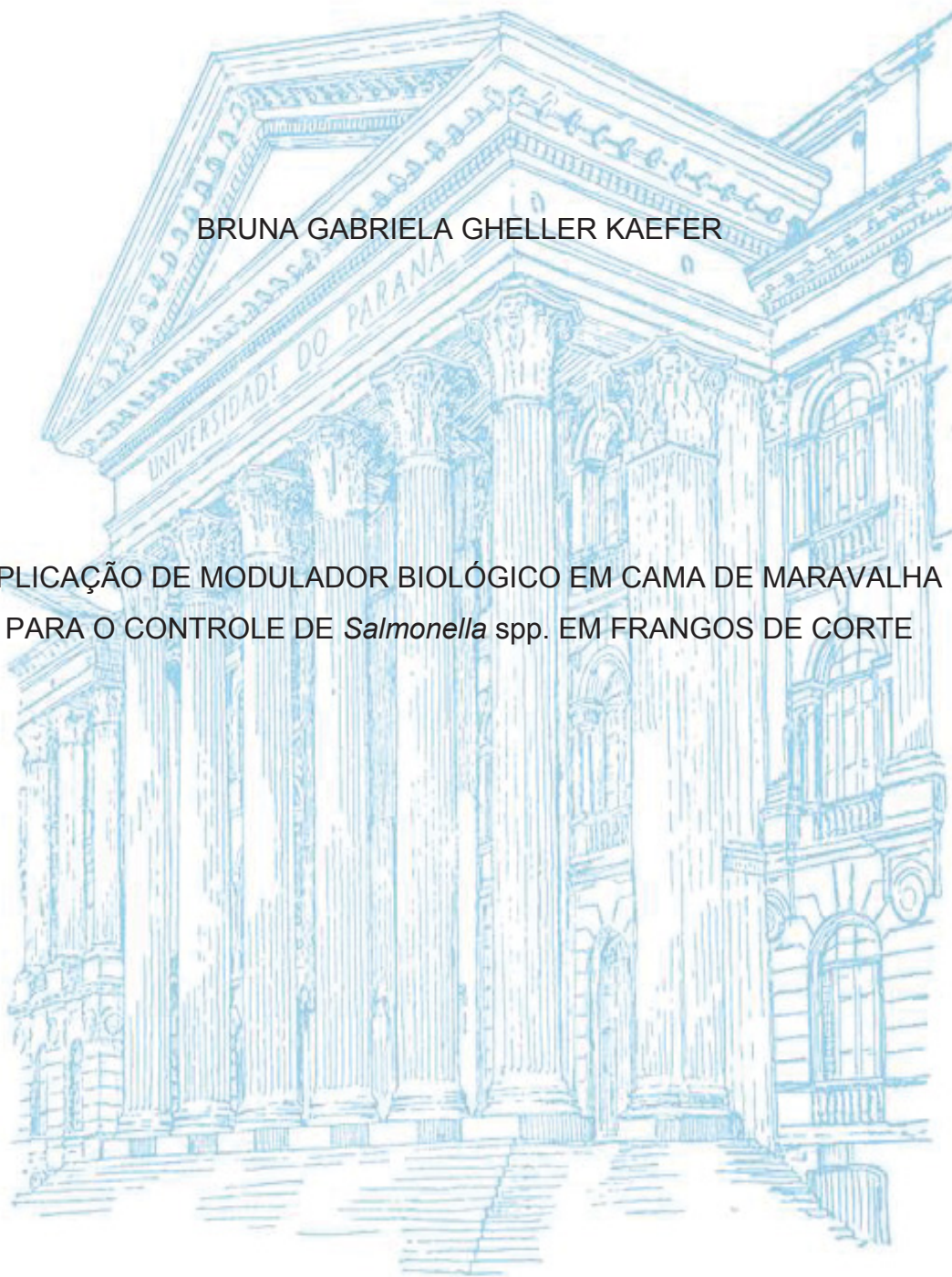


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA GABRIELA GHELLER KAEFER

APLICAÇÃO DE MODULADOR BIOLÓGICO EM CAMA DE MARAVALHA
PARA O CONTROLE DE *Salmonella* spp. EM FRANGOS DE CORTE



PALOTINA

2020

BRUNA GABRIELA GHELLER KAEFER

APLICAÇÃO DE MODULADOR BIOLÓGICO EM CAMA DE MARAVALHA
PARA O CONTROLE DE *Salmonella* spp. EM FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2020

K11 Kaefer, Bruna Gabriela Gheller
Aplicação de modulador biológico em cama de maravalha
para o controle de *Salmonella* em frangos de corte / Bruna
Gabriela Gheller Kaefer– Palotina,2020.
97f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1.BAC TRAT 2A®. . 2 .Avicultura. 3. Salmonelose. 4. Desa-
fio sanitário. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade
Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA GABRIELA GHELLER KAEFER** intitulada: **Aplicação de modulador biológico em cama de maravalha para o controle de *Salmonella* spp. em frangos de corte**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 27 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica

29/10/2020 14:32:36.0

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/10/2020 16:27:39.0

VINICIUS CUNHA BARCELLOS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/10/2020 10:32:59.0

JULIANO GONÇALVES PEREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO)

Assinatura Eletrônica

29/10/2020 15:48:25.0

CIBELI VIANA
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO AVANTIS)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela tranquilização durante meus desabafos, renovando a cada dia minhas forças e disposição para continuar firme e seguindo em frente, mesmo diante de tantas dúvidas e medos.

Aos meus pais, Ivete e Gilmar, pela dedicação incondicional na minha educação. Por sempre estarem presentes em minha vida, pelo amor, carinho, colo, zelo, ao longo de todos esses anos, além do apoio, do incentivo e da segurança que sempre me transmitiram para eu vencer as dificuldades.

Ao meu esposo Kaian, pelo apoio, pela enorme paciência nos momentos de crise, por entender a ausência nos momentos em que foi necessária dedicação exclusiva aos estudos. Obrigada por todo amor, incentivo e compreensão!

Ao meu orientador, Professor Dr. Luciano dos Santos Bersot pela oportunidade e disponibilidade de me orientar, pelos conselhos, apoio e ensinamentos a mim transmitidos durante esses dois anos.

Ao pessoal do LACOMA (colegas de mestrado, residentes, estagiários ic's) por toda ajuda durante a minha pesquisa.

Ao LACOMA e à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional.

Ao professor Vinícius Cunha Barcellos e professora Geuza Catanhêde, pelas caronas todos os dias no trecho Toledo – Palotina.

À CAPES por conceder a bolsa, possibilitando minha dedicação exclusiva durante o período do mestrado.

A todos muito obrigada!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A[®] adicionado na cama frente a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* sp. durante o alojamento de frangos de corte em dois estudos: um em infectório experimental, realizado entre fevereiro e agosto de 2019 e outro a campo, realizado entre março de 2018 e agosto de 2019. O primeiro estudo foi subdividido em duas partes, uma primeira com dois tratamentos: E1T1– sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A[®] na cama e E1T2 – sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A[®] na cama; a segunda parte também com dois tratamentos: E2T1 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A[®] na cama e E2T2 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A[®] na cama. O segundo estudo, realizado a campo, foi composto por dois barracões, sendo que a cama utilizada no barracão 1 foi o controle negativo (C) e a cama do barracão 2 foi o tratamento (T), sendo tratada com o modulador biológico BAC TRAT A[®]. Além da avaliação do efeito do modulador biológico, no segundo estudo ainda foram avaliados perfil genotípico e fenotípico dos isolados obtidos, além da análise de resistência antimicrobiana. No primeiro estudo, o modulador biológico apresentou resultados positivos apenas na primeira parte, observando-se uma redução significativa nas contagens de *Salmonella* tanto para a cama ($P<0,01$) quanto para o ceco ($P<0,05$) no tratamento em que houve aplicação do produto (E1T2). Na segunda parte do primeiro estudo não se observou diferença estatística significativa entre os tratamentos. No segundo estudo, realizado a campo, o modulador também apresentou desempenho positivo para a diminuição do desafio sanitário envolvendo a presença de *Salmonella* sp. durante a criação de aves. Tanto no ambiente quanto no ceco das aves, por ação indireta, houve uma diminuição da carga do patógeno, principalmente nos estágios finais do ciclo de criação, possivelmente provocada pela exclusão competitiva na cama do aviário e modulação biológica da microbiota das aves em contato com o produto.

Palavras-chave: BAC TRAT 2A[®]. Avicultura. Salmonelose. Desafio Sanitário.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the biological modulator BAC TRAT 2A[®] added to poultry bed considering the survival and multiplication of *Salmonella* sp. during broiler housing in two studies: one in a bioterium, carried out between February and August 2019 and another in the field, carried out between March 2018 and August 2019. The first study was divided into two parts, the first with two treatments: E1T1– without inoculation of *Salmonella* Heidelberg and without inoculation of BAC TRAT A[®] in bed and E1T2 - without inoculation of *Salmonella* Heidelberg and with inoculation of BAC TRAT A[®] in bed ; the second part also with two treatments: E2T1 - with inoculation of *Salmonella* Heidelberg and without inoculation of BAC TRAT A[®] in bed and E2T2 - with inoculation of *Salmonella* Heidelberg and with inoculation of BAC TRAT A[®] in bed. The second study, carried out in the field, consisted of two sheds, the bed used in shed 1 being the negative control (C) and the bed in shed 2 being the treatment (T), being treated with the biological modulator BAC TRAT A[®]. In addition to evaluating the effect of the biological modulator, the second study also evaluated the genotypic and phenotypic profile of the isolates obtained, in addition to the analysis of antimicrobial resistance. In the first study, the biological modulator showed positive results only in the first part, observing a significant reduction in *Salmonella* counts for both the bed ($P < 0.01$) and the cecum ($P < 0.05$) in the treatment in which the product was applied (E1T2). In the second part of the first study, there was no statistically significant difference between treatments. In the second study, carried out in the field, the modulator also showed a positive performance for reducing the health challenge involving the presence of *Salmonella* sp. during poultry farming. Both in the environment and in the cecum of the birds, by indirect action, there was a decrease in the pathogen load, mainly in the final stages of the breeding cycle, possibly caused by the competitive exclusion in the aviary litter and biological modulation of the birds' microbiota in contact with the product.

Keywords: BAC TRAT 2A[®]. Poultry industry. Salmonellosis. Health challenge.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 - MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	18
--	----

Capítulo I

FIGURA 1 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCEDIMENTO INICIAL AO QUAL AS AMOSTRAS DE CAMA E CECO FORAM SUBMETIDAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> sp. DE ACORDO COM A METODOLOGIA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL MINIATURIZADO (mNMP) (ISO/TS 6579-2:2012).	48
---	----

Capítulo II

Figura 1. Percentual de isolados de <i>Salmonella</i> sp. resistentes a cada agente antimicrobiano testado. NAL: Ácido Nalidíxico; CTX: Cefotaxima; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; DOX: Doxíciclina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftadizima; TET: Tetraciclina; CRO: Ceftriaxone; ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; CLO: Cloranfenicol; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina.....	68
---	----

Figura 2. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de 20 padrões únicos de cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium e suas monovariantes isoladas de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada usando o coeficiente de similaridade de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered.....	70
--	----

Figura 3. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de sete padrões únicos de cepas de <i>Salmonella</i> SaintPaul de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered	70
---	----

Figura 4. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de três padrões únicos de cepas de <i>Salmonella</i> Agona de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered.	71
---	----

Apêndice A

Figura A. Teste confirmatório fenotípico para produção de enzimas ESBL.....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS REALIZADOS EM AMBOS OS ESTUDOS QUANTO À INOCULAÇÃO DE <i>Salmonella</i> Heidelberg E INOCULAÇÃO DE BAC TRAT 2A® NA CAMA.....	43
TABELA 2 – DESCRIÇÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS DENTRE OS DOIS ESTUDOS NOS DOIS TEMPOS DE COLETA, SEUS TRATAMENTOS, TIPO E NÚMERO DE AMOSTRA E UNIDADE ANALÍTICA.....	45
TABELA 3 – MÉDIA, DESVIO PADRÃO (DP) E SIGNIFICÂNCIA DA QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> POR LOG NMP/G NAS CAMAS E CECOS DE TODOS OS TRATAMENTOS.....	50
TABELA 4 – ANÁLISE QUALITATIVA DE <i>Salmonella</i> EM CAMA E CECO PARA TODOS OS TRATAMENTOS.....	50

CAPÍTULO II

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados para a realização do experimento.....	58
Tabela 2. Descrição dos tempos de coleta e amostras coletadas em cada tempo.....	59
Tabela 3. Número de resultados positivos e negativos dentre o total de amostras coletadas para a análise de pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	63
Tabela 4. Comparação apenas entre as amostras positivas para <i>Salmonella</i> sp. provenientes de swab cecal, swab de arrasto e cama, entre os grupos controle e tratamento de acordo com o dia de coleta (n=132)	63
Tabela 5. Efeito da origem da amostra (swab cecal, cama e swab de arrasto) sobre a presença de <i>Salmonella</i> nos dias de coleta 21, 35 e 47 (n=132)	64
Tabela 6. Média da quantificação de <i>Salmonella</i> sp. em pool de cama e pool de ceco das aves.....	64
Tabela 7. Sorovares de <i>Salmonella</i> identificados na pesquisa de acordo com as amostras de onde foram coletados.....	65
Tabela 8. Fenótipos de resistência dos 67 isolados de <i>Salmonella</i> sp. frente às classes de antimicrobianos testados.....	66
Tabela 9. Fenótipos de resistência dos 67 isolados de <i>Salmonella</i> sp. obtidos de cadeia avícola frente aos antimicrobianos testados.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
	2.1 AVICULTURA NO BRASIL	11
	2.2. <i>Salmonella</i> sp.....	12
	2.2.1 Aspectos gerais	12
	2.2.2 Importância de <i>Salmonella</i> para a saúde pública	14
	2.2.3 A importância de <i>Salmonella</i> na cadeia avícola	16
	2.3 MODULADOR BIOLÓGICO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	26
3	OBJETIVOS	39
	3.1 OBJETIVO GERAL	39
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	CAPÍTULO I – EFEITO DA ADIÇÃO DE BAC TRAT 2A® SOBRE <i>Salmonella</i> EM CAMA DE INFECTÓRIO EXPERIMENTAL	40
	4.1 INTRODUÇÃO	41
	4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
	4.2.1 Local e período experimental.....	42
	4.2.2 Delineamento experimental	43
	4.2.3 Preparo do inóculo de <i>Salmonella</i> para contaminação da cama	44
	4.2.4 Preparo da cama e inoculação do modulador biológico	44
	4.2.5 Coleta e processamento das amostras.....	44
	4.2.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	46
	4.2.7 Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.	46
	4.2.8 Análise estatística	48
	4.2.9 Aspectos éticos.....	49
	4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
	4.4 CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	53
5	CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA <i>FOODS</i>	56
	5.1 Introdução	56
	5.2. Materiais e Métodos	58
	5.2.1. Local e período experimental	58

5.2.2. Delineamento experimental.....	58
5.2.3. Inoculação do modulador biológico	58
5.2.4. Coleta e processamento das amostras	58
5.2.5. Pesquisa de Salmonella sp.....	59
5.2.6. Quantificação de Salmonella sp.....	60
5.2.7. Sorotipificação.....	60
5.2.8. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	61
5.2.9. Detecção de Salmonella produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).....	61
5.2.10. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	61
5.2.11. Análise estatística	62
5.3. Resultados e Discussão	62
5.3.1. Eficácia do modulador.....	62
5.3.2. Sorotipificação.....	64
5.3.3. Resistência antimicrobiana	66
5.3.4. Perfil de macrorrestrição dos isolados	69
5.4. Conclusões.....	71
Apêndice A.....	71
Referências	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte representa um dos principais segmentos do complexo agroindustrial brasileiro, sendo o país líder mundial na produção e segundo maior exportador de carne de frango. Em 2018, 14% da produção mundial de carne de frango foi oriunda da avicultura brasileira, sendo os três estados do sul do país responsáveis por mais de 65% da produção total (USDA, 2019).

Ao mesmo tempo que o comércio de alimentos se expande em todo o mundo, a segurança dos alimentos torna-se uma preocupação compartilhada entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento, conforme ligações importantes entre alimentação e saúde são cada vez mais reconhecidas (ANTUNES et al., 2016). Uma grande variedade de agentes químicos, físicos e biológicos podem afetar a segurança de alimentos, sendo os últimos considerados de maior importância e são um alvo constante de medidas de prevenção, monitoramento e controle dentro das indústrias de alimentos (JAY, 2005).

Neste contexto, merecem destaque os patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar, devido às grandes perdas e danos causados à saúde pública, principalmente com relação aos grupos de risco (FORSYTHE, 2013). De acordo com dados do Ministério da Saúde, *Salmonella* sp. é o segundo patógeno que mais causa surtos de doenças veiculadas por alimentos no Brasil (BRASIL, 2019).

Na produção de frangos de corte são várias as fontes de contaminação das aves por *Salmonella* no campo e uma delas é a cama, geralmente composta por maravalha, sendo que há também a presença de penas, restos de ração e água, além de acúmulo de excretas e secreções das aves. Assim, uma microbiota diversificada proveniente do trato digestório dos animais se estabelece neste ambiente, cujo potencial patogênico pode variar de acordo com a sanidade das aves e as práticas de manejo ambiental (VAN WANGENBERG et al., 2012).

Com a ascensão da produção avícola no Brasil, aliada a necessidade de se pensar em novas possibilidades de manejo e tratamento da cama de frango, métodos biológicos como a utilização de micro-organismos competitivos e

benéficos que impedem a sobrevivência microbiana vêm ganhando destaque neste cenário (LARRISON et al., 2010; ROLL et al., 2008). Neste sentido, tendo em vista que a microbiota da ave é formada a partir do contato com micro-organismos presentes no ambiente, a presença de uma cepa bacteriana com efeito benéfico em um ambiente como a cama poderia direcionar a formação da microbiota endógena (JURICOVA et al., 2012).

Os moduladores biológicos são um exemplo de coleção de cultivos microbianos que são biotecnologicamente utilizados com finalidade de reduzir ou até mesmo eliminar a contaminação de alguns micro-organismos do ambiente que são indesejáveis à sanidade e a inocuidade do produto (GAYLARDE et al., 2005). Geralmente, produtos comerciais contendo micro-organismos que são utilizados como probióticos têm sua utilização via ração, água ou são inoculados pelo bico ou borrifados nos animais (SCHNEITZ, 1992). Além destas formas de administração, outras opções estão sendo propostas para a aplicação destes produtos, como por exemplo a aspersão na cama das aves e nos utensílios, com intuito de promover um ecossistema equilibrado dentro do aviário (OH et al., 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVICULTURA NO BRASIL

A carne de frango sempre esteve presente na história do Brasil, sendo que já nas primeiras embarcações vindas de Portugal as aves já eram utilizadas como suprimento alimentar (ARASHIRO, 1989). A partir de 1900, com o crescente desenvolvimento do país e aumento da população, foi fundada em 1913 a Sociedade Brasileira de Avicultura, em São Paulo, que tinha como um de seus principais objetivos desenvolver a avicultura no Brasil e trazer novos rumos para este setor (MALAVAZZI, 1977).

A partir das décadas de 50 e 60, o setor agroindustrial brasileiro passou por várias mudanças em sua estrutura produtiva (BELUSSO e HESPANHOL, 2010), sendo que a avicultura brasileira passou a ter caráter industrial e consolidou-se, a partir de alguns eixos fundamentais, como a produção de aves com melhor conversão alimentar e curto período de vida (TAVARES e RIBEIRO, 2007). Juntamente com incentivos fiscais e créditos a juros baixos, houve grande modernização do setor neste período, o que levou ao aumento da produção e da produtividade, crescimento das atividades ligadas à exportação e aumento do grau de processamento industrial dos produtos (OLIVEIRA e NÄÄS, 2012).

Atualmente, a avicultura de corte representa um dos principais segmentos do complexo agroindustrial brasileiro, sendo o país líder mundial na exportação e o segundo maior produtor de carne de frango. Em 2018, 14% da produção mundial de carne de frango foi oriunda da avicultura brasileira, sendo os três estados do sul do país responsáveis por mais de 65% da produção total (USDA, 2019). Segundo o Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná - Sindiavipar, a avicultura paranaense vem conseguindo superar a crise econômica e crescer acima da média brasileira nos últimos anos, sendo que, desde o ano de 2010 as exportações paranaenses cresceram cerca de 61%. Atualmente, o Paraná é o estado que comanda a avicultura no Brasil, sendo responsável por cerca de 38% de toda a carne de frango produzida e exportada pelo país, números que garantem à avicultura paranaense destaque nacional e internacional junto à indústria de proteína animal (SINDIAVIPAR, 2020).

2.2. *Salmonella* sp.

2.2.1 Aspectos gerais

O gênero *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é constituído de bacilos Gram negativos, mesófilos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e em sua maioria são móveis, devido à presença de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis (FORSYTHE, 2013). A existência do gênero *Salmonella* data de muitos anos, porém, só recebeu este nome no ano de 1900, em homenagem ao médico veterinário Daniel Elmer Salmon, responsável pelo isolamento em intestinos de suínos do micro-organismo *Bacillus cholerasuis*, hoje conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Cholerasuis. Desde então, inúmeras modificações na nomenclatura do gênero foram propostas (SALMONELLA SUBCOMMITTEE, 1934; EUZEBY, 2016a; EUZEBY, 2016b; EUZEBY, 2016c; RYAN et al., 2017).

Atualmente, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, que está subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *indica*. As subespécies de *S. enterica* agrupam em torno de 2659 sorovares, sendo que *S. enterica* subsp. *enterica* agrupa o maior número de sorovares e é epidemiologicamente mais relevante, pois compreende únicos sorovares que acometem humanos e animais de sangue quente (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). *S. enterica* subsp. *salamae*, subsp. *arizonae* e subsp. *diarizonae* são frequentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais de sangue frio e raramente de humanos ou animais de sangue quente. *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos (POPOFF e LE MINOR, 2005).

Adicionalmente, as espécies de *Salmonella* também são classificadas por sua fórmula antigênica. O esquema de classificação mais difundido e aceito é conhecido como “Kauffmann-White-Le Minor”, que foi inicialmente publicado por Fritz Kauffmann e Philip B. White em 1934 e listava 44 sorovares de *Salmonella* (GRIMONT e WEILL, 2007). Em 1964, quando Kauffmann se aposentou, com o auxílio de Leon Le Minor, o esquema já possuía 958 sorovares e hoje conta com

2659 sorovares descritos, número atualizado pelo Instituto Pasteur em 2014 (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Le Minor tem grande contribuição na maioria dos sorovares conhecidos e é por isso que o esquema por muitos anos chamado de “Kauffmann-White” atualmente leva seu nome. Este esquema divide o gênero em tipos sorológicos em função dos antígenos de superfície principais, o antígeno somático O e o antígeno flagelar H, que apresentam alta variabilidade, sendo esse o fator responsável pela designação dos mais de 2600 sorovares existentes (CDC, 2020; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; SALMONELLA SUBCOMMITTEE, 1934).

Os antígenos O são polissacarídeos que compõe a parede celular das bactérias Gram negativas e são constituídos por unidades oligossacarídicas repetitivas, as cadeias laterais. A especificidade do antígeno somático é determinada pela variação em número, tipo e/ou ligação entre os diferentes açúcares destas cadeias (LINDBERG e LE MINOR, 1984; RICK, 1987). Este antígeno apresenta 67 fatores antigênicos reconhecidos que são utilizados para a identificação sorológica de *Salmonella* (DA SILVA et al., 2017).

Os antígenos H são derivados do flagelo das cepas móveis e são compostos de subunidades de flagelina, que são a porção filamentosa do flagelo bacteriano (NATARO et al., 2011). Geralmente, as bactérias expressam apenas um antígeno flagelar por vez, isso se chama expressão flagelar monofásica. Uma cepa de *Salmonella* pode produzir dois tipos de flagelos com características antigênicas diferentes, de fase 1 e de fase 2, podendo ser expressos de forma monofásica ou bifásica, como ocorre com alguns sorovares do gênero. Esta alternância na produção é chamada de variação de fase e o gênero *Salmonella* é o único dentre as enterobactérias com essa capacidade. Alguns poucos sorovares são monofásicos, como ocorre com *S. Typhi* e *S. Enteritidis* e outros não produzem qualquer tipo de flagelo, por serem imóveis, como é o caso dos sorovares *Pullorum* e *Gallinarum* (GRIMONT et al., 2000; GRIMONT e WEILL, 2007).

Além dos antígenos O e H, cepas de *S. Typhi*, *Paratyphi* e *Dublin* também podem apresentar antígenos capsulares (Vi) que, se presentes, estão relacionados a maior virulência (POPPOF e LE MINOR, 2005). Os antígenos O e Vi são termo resistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por duas horas, ao contrário dos antígenos H que são termolábeis. Para

determinação do sorovar de uma *Salmonella*, os antígenos H precisam ser eliminados pelo aquecimento (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

2.2.2 Importância de *Salmonella* para a saúde pública

De acordo com a patologia causada, três grandes grupos podem ser considerados a partir dos sorovares de *Salmonella* existentes: as febres tifoides, causadas por *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites ou salmoneloses causadas pelos demais sorovares, responsáveis pela transmissão de *Salmonella* de animais para humanos na maior parte do mundo (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O gênero *Salmonella* é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato gastrointestinal (TGI) do homem e de animais o principal reservatório natural do patógeno. Entre os animais de produção, as aves são o reservatório de maior importância, principalmente pela adaptação de inúmeros sorovares ao TGI destes animais. As aves podem ser portadoras assintomáticas do micro-organismo, excretando o patógeno de forma contínua pelas fezes, causando a disseminação de *Salmonella* durante a produção, abate e processamento, o que pode ocasionar contaminação cruzada de grande importância nos abatedouros (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Em geral, a colonização pela maioria dos sorovares de *Salmonella enterica* não afeta a performance das aves, desta forma, infecções assintomáticas podem aumentar a probabilidade de transmissão zoonóticas para os seres humanos na cadeia alimentar (CARTER et al., 2009). Alguns trabalhos demonstram a grande frequência do sorovar Enteritidis em carne de aves abatidas no Brasil até a primeira década dos anos 2000, sendo posteriormente substituído por outros sorovares (CARDOSO et al., 2015; DUARTE et al., 2009; PALMEIRA et al., 2016; REZENDE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; SANTOS et al., 2000).

Estudos recentes têm mostrado o aumento da taxa de infecção de frangos por *Salmonella* Heidelberg e Minnesota no Brasil nos últimos anos (CARDOSO et al., 2015; VOSS-RECH et al., 2015). Acredita-se que esse aumento seja devido à melhoria nas medidas de controle para os sorovares Enteritidis e Typhimurium e, desta forma, houve o aumento da frequência de outros

sorovares. *Salmonella* Heidelberg foi o sorovar mais prevalente em carne de frango no Brasil no ano de 2013 (RASFF, 2015) e é um sorovar que pode infectar os seres humanos pois possui grande capacidade invasiva e pode causar doença com alto grau e severidade quando comparado a outros sorovares (CHITTICK et al., 2006). Atualmente, *Salmonella* Heidelberg está entre os sorovares mais prevalentes em casos de salmonelose humana nos Estados Unidos e também no Canadá e é um dos cinco principais sorovares associados com salmonelose humana no mundo (CDC, 2014; PHAC, 2014).

Apesar das diversas fontes de contaminação por *Salmonella*, a veiculação por alimentos é a principal e mais relevante, com grande impacto global na saúde humana (MAJOWICZ et al., 2010). Os surtos de salmonelose podem envolver os mais variados tipos de alimentos, no entanto, produtos de origem animal, em especial a carne de frango e outros produtos avícolas, são os mais frequentemente envolvidos (BARROW e METHNER, 2013; COSBY et al., 2015; FOLEY et al., 2011; VANDEPLAS et al., 2010). Vários estudos em países desenvolvidos demonstraram a presença de *Salmonella* não-tifoide em diferentes estágios da cadeia produtiva do frango de corte (DIAS et al., 2016; KIM et al., 2015; MAURISCHAT et al., 2014; THUNG et al., 2016). Essa contaminação das aves se deve principalmente ao seu sistema intensivo de criação, condições de manejo e abate dos animais, o que facilita a disseminação deste patógeno desde o início da criação até o produto final (ANTUNES et al., 2016).

As salmoneloses são a principal causa de diarreia bacteriana em todo o mundo, sendo estimados aproximadamente 153 milhões de casos de gastroenterite e 57.000 mortes a cada ano (HUNTER e FRANCOIS WATKINS, 2018). Ainda, dados do Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) apontam que para cada caso confirmado de doença causada por *Salmonella*, há aproximadamente mais 30 casos que não são notificados. Dados do ano de 2017 mostram a ocorrência de 125 surtos de salmonelose veiculada por alimentos nos Estados Unidos, o que resultou em 9 mortes (CDC, 2020). Na União Europeia, mais de 91.000 casos de salmonelose em humanos são reportados a cada ano, o que gera um gasto de aproximadamente três bilhões de euros. Em 2017, 1.241 surtos foram notificados, sendo 91.662 casos de salmonelose humana confirmados (EFSA, 2018).

No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019), entre 2009 e 2018 foram notificados 2.431 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), e destes, 11,3% foram devido à *Salmonella*, que atualmente ocupa o segundo lugar no ranking. Com relação à carne de frango, em trabalho realizado por Bersot et al. (2019) entre os anos de 2007 a 2013 avaliando-se carcaças de frango no oeste do estado do Paraná, foi encontrado um percentual de 19,41% dentre as 340 carcaças analisadas.

2.2.3 A importância de *Salmonella* na cadeia avícola

Como as aves podem ser portadoras assintomáticas de *Salmonella*, havendo a possibilidade de excretar o patógeno continuamente por suas fezes, há uma preocupação quanto à disseminação do patógeno na cadeia avícola, desde a produção até o abate e processamento. Na produção, muitas vezes faz-se necessário o uso de medicamentos antibióticos para controlar este problema (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O uso extensivo e indiscriminado de antimicrobianos pelos seres humanos e também na produção animal nas últimas décadas levou ao aumento da resistência antimicrobiana entre várias bactérias, sendo o uso veterinário o maior contribuinte para o desenvolvimento da múltipla resistência bacteriana (BUTAYE et al., 2006; CRUCHAGA et al., 2001; MARSHALL e LEVY, 2011; YILDIRIM et al., 2011). Por muitos anos, a contribuição dos animais de produção como reservatório de resistência antimicrobiana com impactos na saúde humana foi controversa, porém, evidências têm sido acumuladas relacionando particularmente a produção avícola com a doença humana (AARESTRUP, 2015; EFSA, 2015; SHAH e KOREJO, 2012; WHO, 2012).

Em particular, cepas de *Salmonella* com multirresistência a drogas antimicrobianas têm sido constantemente relatadas na produção animal e em alimentos, resultando na exposição humana a estes micro-organismos que são disseminados via cadeia alimentar (ABD ELGHANY et al., 2015; ANJUM et al., 2011; LETTINI et al., 2016; NGUYEN et al., 2016; OUESLATI et al., 2016; RODRIGUEZ-RIVERA et al., 2016). Estas cepas apresentam resistência a classes de antimicrobianos de importância clínica e que têm sido recomendadas

por vários anos para tratamento de *Salmonella*, incluindo as fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro (CHEN et al., 2013; HUR et al., 2012; PARRY et al., 2008). O aparecimento e disseminação de micro-organismos resistentes aos antibióticos se torna um grande problema para a saúde pública, visto que os genes de resistência a antimicrobianos incorporados nestas populações bacterianas ameaçam a eficácia de drogas utilizadas para tratar infecções em seres humanos causadas por estes patógenos (LAXMINARAYAN et al., 2016; MEHTA et al., 2018; SOMMER et al., 2017; VAN BOECKEL et al., 2017).

Os níveis mais elevados de resistência microbiana aos antimicrobianos recomendados no tratamento de salmonelose foram detectados em carne de frango e carne de peru (CHANG et al., 2015; THAMES et al., 2012), devido a frequente administração de antibióticos para tratamento de doenças nas aves ou também como promotores de crescimento (VAN BOECKEL et al., 2017; VINUEZA BURGOS, 2017). Este fato sugere a contribuição da cadeia avícola para o aumento da resistência aos antimicrobianos que se distribui através do consumo da carne de aves e produtos relacionados (CUI et al., 2016; EFSA, 2015; GONG et al., 2014; LI et al., 2013). No entanto, há que considerar que os tratamentos inadequados prescritos para humanos e a automedicação também são fatores de grande expressividade para a resistência a antimicrobianos (NAWAZ et al., 2001).

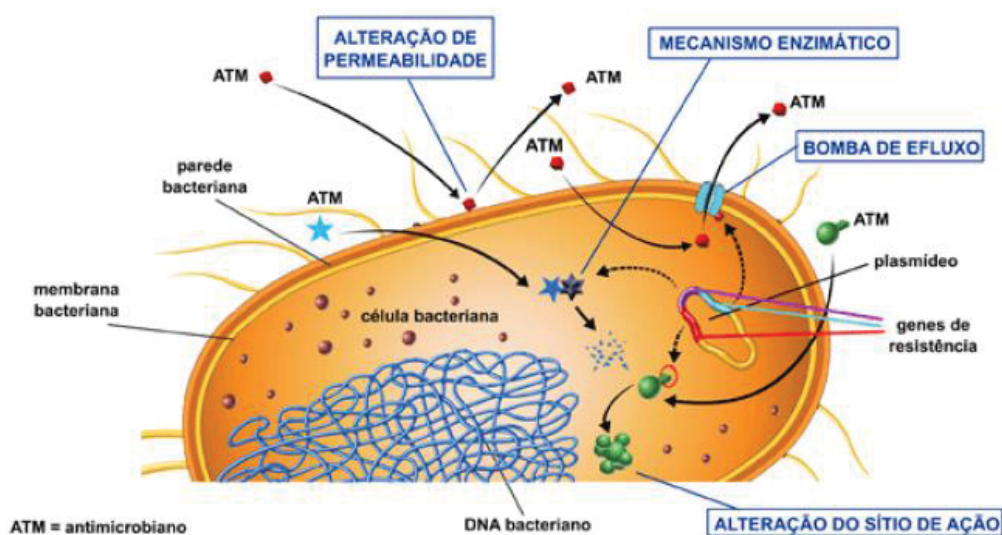
Além do aumento da resistência bacteriana, o uso indevido e indiscriminado dos antibióticos gera acúmulo de resíduos nos produtos animais e também no ambiente, além de desequilíbrio e redução da microbiota benéfica normal do intestino das aves (SEN et al., 2011). Isto têm resultado em severas restrições ou proibições do emprego de antimicrobianos em animais, principalmente na produção avícola nos mais diversos países. Como resultado, o setor avícola industrial deve buscar alternativas para o uso dos antibióticos, a fim de manter a saúde e performance dos animais sob condições comerciais, principalmente quando se trata de patógenos de importância para saúde pública, como é o caso de *Salmonella* (HOSSAIN et al., 2015).

Com relação à resistência antimicrobiana, os micro-organismos podem ser sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos, resistência esta que pode ser natural ou adquirida. A resistência natural é uma característica intrínseca do micro-organismo, que ocorre sem exposição prévia ao antibiótico e seu

conhecimento dentre as mais diversas espécies facilita a escolha do tratamento empírico. Como exemplo pode-se citar a resistência natural de bactérias do gênero *Mycoplasma* frente aos beta-lactâmicos, pois estes micro-organismos não possuem parede celular, local onde atua o antibiótico (RICE e BONOMO, 2005).

A resistência adquirida pode ser advinda de mutação espontânea e seleção, em que as bactérias que transportam mutação no material genético que confere resistência sobrevivem ao uso da droga e as sensíveis são eliminadas, ou também por transmissão de material genético, ou seja, por aquisição de genes de resistência anteriormente presentes em outros micro-organismos, sejam eles da mesma espécie ou não (DZIDIC et al., 2007; TENOVER, 2006). Quando se trata de resistência adquirida, existem basicamente quatro grandes mecanismos de resistência a antibióticos, são eles: o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico, a bomba de efluxo, a alteração de permeabilidade e a também alteração do local de ação, como pode se observar no esquema básico representado na Figura 1.

FIGURA 1 - MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA



Fonte: Anvisa (2017).

O mecanismo de resistência mais conhecido e importante é a produção de enzimas que degradam ou inativam os antimicrobianos, que podem ser produzidas de modo constitutivo ou induzido (ANVISA, 2007). Um exemplo de grande relevância é a produção das beta-lactamases em micro-organismos

Gram-negativos, em que há quantidades abundantes destas enzimas que hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico presente em alguns tipos de antimicrobianos, que perdem assim a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (DZIDIC et al., 2007; TORTORA et al., 2012).

Em 1963 foi identificada a primeira enzima beta-lactamase, em uma cepa de *E. coli*, na Grécia, que tinha sua codificação por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, possibilitando sua rápida disseminação (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965). Em 1980 foram introduzidas na prática médica as cefalosporinas de terceira geração, que possuíam estrutura molecular resistente à ação das enzimas beta-lactamases existentes até então. Contudo, a pressão de seleção exercida pelo uso massivo dessas novas drogas levou ao surgimento das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Três anos após o início do uso dessas drogas foi relatada a primeira ESBL, denominada SHV-2 em *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (KNOTHE et al., 1983).

As ESBL são capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas, incluindo compostos oximino- β -lactâmicos, mas não cefamicinas ou carbapenêmicos. A maioria das ESBL é inibida por inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (EUCAST, 2013). Neste sentido, a emergência e a disseminação de betalactamases de espectro estendido entre os membros da família *Enterobacteriaceae* têm sido descritas mundialmente como ponto de urgência clínica devido à grande incidência desses isolados em infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS).

A alteração do local alvo onde ocorre a ação do antimicrobiano, de forma a impedir o seu efeito, também constitui um mecanismo importante de resistência. Por meio dele, as bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original (ANVISA, 2007).

Outro mecanismo importante é a alteração da permeabilidade da membrana, que é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado (HILAL-DANDAN e BUNTON, 2008). A permeabilidade limitada é uma propriedade da membrana celular externa de micro-organismos Gram-negativos e reside na presença de proteínas chamadas porinas, que formam canais e regulam a entrada de substâncias. Qualquer alteração estrutural de número,

seletividade ou o tamanho das porinas pode modificar a permeabilidade dos antibióticos, impedindo-os de entrar no espaço periplasmático e agir, levando à resistência da bactéria (ANVISA, 2007; DECLOUR, 2009; DZIDIC et al., 2007; TORTORA et al., 2012).

Ainda, um mecanismo frequente são as bombas de efluxo, em que as proteínas de membrana agem como bombas, fazendo com que ocorra o bombeamento ativo dos antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular antes que atinjam concentrações suficientes para matar a bactéria (ANVISA, 2007; DZIDIC et al., 2007; NISHINO et al., 2009; TENOVER, 2006).

Considerando a relevância de *Salmonella* na cadeia produtiva avícola bem como para a saúde pública no Brasil e em todo o mundo, deve-se ressaltar a importância de implantar medidas e programas de controle em toda a cadeia, de modo a assegurar a qualidade do produto ao consumidor final. Seu controle na cadeia produtiva de frangos de corte é complexo, sendo assim, o conhecimento epidemiológico sobre o patógeno se torna vital para traçar estratégias de intervenção, investimentos e ações de combate (SCHMIDT, 2018)

Tendo em vista a importância da produção avícola brasileira no contexto nacional e internacional, aliada a necessidade de normatização das ações de acompanhamento sanitário, em 19 de setembro de 1994 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA, através da Portaria nº 193, com o estabelecimento de diversas normas e ações para regulamentar a produção avícola e salvaguardar o plantel nacional (BRASIL, 1994). Por meio da Instrução Normativa (IN) nº 78, o PNSA estabeleceu a erradicação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* nos planteis avícolas, sendo que matrizes positivas para estes sorovares deveriam ser sacrificadas. Além disso, essa IN também estabelece a vacinação de matrizes contra *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003a).

Ainda, através da IN nº 70, em 2013 o MAPA instituiu no Brasil o “Programa de redução de patógenos (PRP) – Monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em frangos e perus”, com objetivo de monitorar a prevalência do patógeno nos produtos avícolas em estabelecimentos de abate de aves registrados no Serviço de Inspeção Federal – SIF. Tal monitoramento tem por função principal construir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível

adequado de proteção ao agente, o que permite melhor eficácia das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (BRASIL, 2003b). O PRP instituído no Brasil tem como referência o Programa de Redução de Patógenos Americano, que permite a redução do patógeno através de descontaminantes físicos e/ou químicos, enquanto o programa brasileiro prioriza higiene e boas práticas de fabricação no combate ou redução de *Salmonella* (FINSTAD et al., 2013; USDA/FSIS, 2013).

Com o intuito de agrupar o PNSA com o PRP, em 21 de outubro de 2016 foi instituída a IN nº 20, que tem por objetivo reduzir a prevalência de *Salmonella* sp. e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor. Ela também trouxe modificações relacionadas ao ciclo amostral e aos laboratórios onde as amostras devem ser realizadas. As análises microbiológicas para pesquisa de *Salmonella* sp. nas carcaças são divididas em dois monitoramentos. O primeiro é um monitoramento de autocontrole, em que as análises podem ser realizadas em laboratório definido pela empresa, desde que atenda as exigências e metodologias preconizadas pelo MAPA, devendo haver uma amostragem de 51 carcaças a cada ciclo amostral, sendo aceitável no máximo 12 amostras positivas. O outro monitoramento compreende um ciclo de 8 amostras, em que no máximo 2 amostras positivas são aceitáveis com análises realizadas nos laboratórios da rede oficial ou credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2016).

Tendo como base o fato de que os processos produtivos podem ser bastante complicados, o Brasil conta com outras ferramentas que tem por objetivo produzir um alimento inócuo e seguro do ponto de vista microbiológico, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que são programas de autocontrole exigidos por órgãos internacionais para exportação dos produtos de origem animal (BRASIL, 1997; BRASIL, 1998; BRASIL, 2003b).

As BPF abordam os princípios fundamentais, os procedimentos e os meios necessários para o desenvolvimento de um ambiente de produção de alimentos inócuos e saudáveis (BRASIL, 1997). Estas normas abrangem procedimentos voltados para aspectos higiênico-sanitários que vão desde a matéria-prima até o produto final, cuja eficácia e efetividade devem ser avaliadas por meio de inspeção e/ou investigação (FORSYTHE, 2013). Como parte das

Boas Práticas de Fabricação, os PPHO baseiam-se na higiene das superfícies que entram em contato com o alimento, prevenção contra a contaminação cruzada e contra contaminantes do alimento, identificação e estocagem adequadas de substâncias químicas e de agentes tóxicos, segurança da água e higiene e saúde dos empregados (BRASIL, 2003b).

As medidas básicas de higiene que o estabelecimento deve ter, descritas pelas BPF e pelos PPHO, são pré-requisitos para outros sistemas de qualidade na indústria de alimentos, como o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC, que é um sistema de gerenciamento de risco previamente desenvolvido, tendo como base a avaliação qualitativa do risco (FORSYTHE, 2013). O APPCC se baseia na identificação de perigos específicos e medidas de controle e prevenção em toda a cadeia produtiva do alimento, desde a produção primária até seu consumo, e sua implementação deve ser baseada em evidências científicas dos riscos à saúde humana (BRASIL, 1998).

Outro ponto crítico de grande importância na cadeia avícola é a cama de frangos, considerada um ponto de manutenção e dispersão de bactérias. A cama de frango é uma cobertura que varia de 5 a 10 cm de espessura e fica disposta sobre o piso do galpão onde as aves são alojadas. Geralmente é composta de uma mistura de material celulósico rico em carbono, como serragem ou maravalha de pinus, eucalipto, casca de arroz, sabugo de milho triturado, capins e casca de amendoim (TUYTTENS et al., 2014; WILKINSON et al., 2011). A cama tem por função principal evitar o contato direto entre a ave e o chão durante a criação, proporcionando conforto para os animais durante o período de criação. Além disso, a cama também absorve a umidade eliminada pelas excretas das aves e equipamentos como os bebedouros, confere isolamento térmico e retém o impacto ligado ao peso da ave, evitando a ocorrência de lesões de peito e patas (COLLETT, 2012).

Juntamente com o material que compõe a cama, há também penas, restos de ração e água, além de altas concentrações de excretas e secreções das aves à medida que estas se desenvolvem. Assim, uma microbiota diversificada vinda do trato digestório dos animais se estabelece na cama, além da presença de outros micro-organismos, como fungos e bactérias, cujo potencial patogênico pode variar de acordo com a sanidade das aves e as práticas de manejo ambiental (LOPES ASSIS et al., 2013; VAN WANGENBERG et al., 2012). Dentre

os micro-organismos mais frequentemente encontrados neste ambiente, são encontrados vários patógenos indesejáveis, como por exemplo *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (WERLE et al., 2010).

A cama das aves pode ser renovada a cada ciclo de produção ou ser reutilizada, prática esta que é comumente realizada pelo segmento avícola no Brasil e contribui grandiosamente para a redução do volume de resíduos a serem dispostos, minimizando assim os eventuais impactos causados no meio ambiente além de diminuir os custos de produção (CHINIVASAGAM et al., 2012; ROLL et al., 2011). Contudo, a reutilização da cama em lotes sucessivos pode dificultar a desinfecção do ambiente, o que afeta a qualidade microbiológica do sistema de produção, provocando alterações na atividade de água, pH, temperatura, umidade e presença de amônia (DUMAS et al., 2011; LOPES ASSIS et al., 2013). Estas condições contribuem para a prevalência e disseminação de micro-organismos de risco no ambiente, como a *Salmonella* spp. (STRINGFELLOW et al., 2010), o que gera grande preocupação para a saúde pública devido à possibilidade de contaminação da água e do solo (PALHARES e KUNZ, 2011; ROBERTS et al., 2013).

Para que a prática da reutilização seja considerada segura e eficiente, o material da cama deve ser submetido a tratamentos adequados para auxiliar na redução da carga microbiana patogênica, como o tratamento químico e físico (BROUCEK e CERMAK, 2015; CHEN et al., 2015; WANGEN et al., 2013). Contudo, na produção avícola atual, estes tratamentos não têm sido eficientes o suficiente para minimizar o risco microbiológico e ao mesmo tempo garantir a sustentabilidade ambiental (SHEPHERD e FAIRCHILD, 2010). Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de patógenos na avicultura, como os moduladores biológicos.

2.3 MODULADOR BIOLÓGICO

Com a ascensão da produção avícola no Brasil, aliada a necessidade de se pensar em novas possibilidades de manejo e tratamento da cama de frango, métodos biológicos como a utilização de micro-organismos competitivos e benéficos que impedem a sobrevivência microbiana vêm ganhando destaque

neste cenário (LARRISON et al., 2010; ROLL et al., 2008). Neste sentido, tendo em vista que a microbiota da ave é formada a partir do contato com micro-organismos presentes no ambiente, a presença de uma cepa bacteriana com efeito benéfico em um ambiente como a cama poderia direcionar a formação da microbiota endógena (JURICOVA et al., 2012). Além disso, a adição de micro-organismos benéficos pode acelerar o processo de degradação dos dejetos e ainda podem inviabilizar o desenvolvimento e a sobrevivência de bactérias patogênicas (ALIAKBARPOUR et al., 2012).

Os moduladores biológicos são um exemplo de coleção de cultivos microbianos que são biotecnologicamente utilizados com finalidade de reduzir ou até mesmo eliminar a contaminação de alguns micro-organismos do ambiente que são indesejáveis à sanidade e a inocuidade do produto (GAYLARDE et al., 2005). Para o emprego desta tecnologia, certos critérios devem ser levados em consideração, como a atividade catabólica da cultura mista, capacidade de reduzir compostos a baixas concentrações e em níveis aceitáveis, a não geração de produtos tóxicos e o baixo custo (BOOPATHY, 2000; HE et al., 2006). Para compor o modulador, geralmente utiliza-se micro-organismos que também são utilizados como probióticos, como algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo as bactérias consideradas o elemento principal (ANDRADE, 2010).

Roll et al. (2008) relataram que com a utilização de moduladores biológicos há o favorecimento de comunidades bacterianas positivas no ambiente aviário. Adicionalmente, caso haja a ingestão destes micro-organismos presentes no ambiente tratado, pode-se esperar uma proteção às aves receptoras contra colonização por patógenos, além da melhora no desempenho dos animais, assim como fazem os probióticos comumente adicionados à alimentação destes animais (ROLL et al., 2008).

Os micro-organismos vivos, quando usados como suplementos alimentares são chamados de probióticos e tem a capacidade de afetar benéficamente o hospedeiro, modificando sua microbiota, podendo formar uma barreira física que impede a colonização de agentes patogênicos na parede do intestino e seus efeitos prejudiciais à saúde intestinal (MEURER et al., 2010). A probiose surgiu como uma nova ciência com aplicações na agropecuária como uma alternativa ao uso dos antibióticos, tendo em vista o aumento comprovado

na resistência dos micro-organismos aos antibióticos de escolha para tratamento de enfermidades (HONG et al., 2005).

Geralmente, produtos comerciais contendo micro-organismos que são utilizados como probióticos têm sua utilização via ração, água ou são inoculados pelo bico ou borrifados nos animais (SCHNEITZ, 1992). Além destas formas de administração, outras opções estão sendo propostas para a aplicação destes produtos, como por exemplo a aspersão na cama das aves e nos utensílios, com intuito de promover um ecossistema equilibrado dentro do aviário (OH et al., 2017).

A ação antibacteriana dos moduladores biológicos pode ser atribuída à exclusão por competição (LEE et al., 2010) ou também pela produção de enzimas extracelulares produzidas pelo complexo bacteriano, destacando-se a alfa-amilase, celulase, metaloproteases, proteases, hemicelulase, fitase, dentre outras (AHMED et al., 2014; PAN e YU, 2014; SUPRIYATI et al., 2015).

Dentre as bactérias mais utilizadas como moduladores biológicos, destaca-se o gênero *Bacillus*, que também são utilizadas como probióticos em aditivos alimentares na avicultura (DAVIES et al., 2008; NITIKANCHANA et al., 2011; WANG et al., 2009). Estas bactérias possuem uma certa estabilidade, podendo formar esporos, tornando-as bastante resistentes à degradação enzimática e à diferentes temperaturas e pH, o que possibilita a inoculação e manutenção no ambiente (HONG et al., 2005).

Bacillus licheniformis, comumente utilizado como modulador, está diretamente ligado à produção de bacteriocinas, que são moléculas de potente efeito antimicrobiano contra alguns tipos de micro-organismos que competem por substratos nas camas de aviário (ABRIOUEL et al., 2011; AHMED et al., 2014). *B. subtilis* também tem ação benéfica em camas de aviário, sendo relacionada com a produção de enzimas proteases responsáveis pela redução na contagem de enterobactérias após 24 horas de contato (BRITO e TAGLIARI, 2007). Ainda, no estudo de Knap et al. (2011), a utilização de *B. subtilis* em aves infectadas com *Salmonella* Heidelberg mostrou que o uso deste micro-organismo reduziu significativamente a carga de *S. Heidelberg* tanto no trato gastrointestinal das aves quanto no ambiente.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Science**, v.370, 2015.

ABD-ELGHANY, S. M.; SALLAM, K. I.; ABD-ELKHALEK, A.; TAMURA, T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 143, n. 5, p. 997-1003, 2015. DOI: 10.1017/S0950268814001708.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.; NABIL, O.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. **FEMS Microbiology Review**, v. 35, p. 201-232, 2011.

AHMED, S. T.; ISLAM, M.; MUN, H. S.; SIM, H. J.; KIM, Y.; YANG, C. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-1971, 2014.

ALIAKBARPOUR, H. R.; CHAMANI, M.; RAHIMI, G.; SADEGHI, A. A.; QUJIEQ, D. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 25 p. 1285-1293, 2012.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO F. e JARDIM, I. F. Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Campinas, v.35, n. 3, p.17-43, 2010.

ANJUM, M. F.; CHOUDHARY, S.; MORRISON, V.; SNOW, L. C.; MAFURA, M.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. and WOODWARD, M. J. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n.3, p. 550-559, 2011.

ANTUNES, P.; MOURAO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência microbiana – Mecanismos e impacto clínico**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/pas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 21 de junho de 2019.

ARASHIRO, O. **A história da avicultura do Brasil**. São Paulo: Ed. Gessulli, 1989.

BELUSSO D. e HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus Efeitos territoriais. **Revista Percurso**. Maringá, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BERSOT, L.D.S.; VIANA, C.; SERENO, M. J.; PERIN, A.P.; BARCELLOS, V.C. Occurrence of *Salmonella* sp. in poultry carcasses evaluated from the retail trade between 2007 and 2013 in Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.56, n. 2, 2019.
<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.150446>

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, p.63-67, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium, em anexo. **Diário Oficial da União**, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no serviço de inspeção federal (SIF). **Diário Oficial da União**, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 210-Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves**. Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico Sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. 1997. Portaria nº 368 de 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Informe 2018**. 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta--o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Efeito da utilização de Impact – P® na ocorrência de celulite em frangos de corte. **Hora Veterinária**, v. 26, p.13-20, 2007.

BROOKS, J.P. Spatial and temporal analysis of microbial populations in production broiler house litter in the southeastern United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 759-770, 2013.

BROUCEK, J.; CERMAK, B. Emission of harmful gases from poultry farms and possibilities of their reduction. **Ekologia**, v. 34, p.89–100, 2015.

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, n.8, p. 1891-1897, 2006.

CARDOSO, A.; KANASHIRO, A.; STOPPA, G.; CASTRO, A.; LUCIANO, R. and TESSARI, E. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.24, p.1-12, 2015.

CARTER, A.J.; ADAMS, M.R.; WOODWARD, M.J.; LA RAGIONE, R.M. Control strategies for *Salmonella* colonization of poultry: the probiotic perspective. **Food Science and Technology**, v.5, p.103–15, 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: enteric bacteria 2012 Human isolates final report, 2014. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/narms/pdf/2012-annual-report-narms-508c.pdf>>. Acesso em: 27 de junho de 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella and Food**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/index.html>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M. and HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? **Evolutionary Applications**, v.8, n. 3, p. 240–247, 2015.

CHEN, H.M.; WANG, Y.; SU, L.H.; CHIU, C.H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, p. 147-152, 2013.

CHEN, Z.; WANG, H.; JIANG, X. Developing a two-step heat treatment for inactivating desiccation adapted *Salmonella* spp. in aged chicken litter. **Foodborne Pathogens Disease**, v 12, p.104–109, 2015.

CHINIVASAGAM, H. N.; REDDING, M.; RUNGE, G.; BLACKALL, P. J. Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. **British Poultry Science**, v. 51, p. 311-318, 2010.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of food protection**, Ames, v. 69, n. 5, p.1150-53, 2006. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715818.

COLLETT, Stephen. Nutrition and wet litter problems in poultry. **Animal Feed Science Technology**, v.173, p.65–75, 2012.
Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Documentos**, v.149, p. 125-152, 2011.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; WILSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA-RAY, P.J. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: a review. **J Appl Poultry Research**, v. 24, p.408-426, 2015.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A.; GARCIA-PEÑA, J.; FRIAS, N.; USERA, M.A. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Disease**, v. 47, p. 315-321, 2001.

CUI, M.; XIE, M.; QU, Z.; ZHAO, S.; WANG, J.; WANG, Y.; HE, T.; WANG, H.; ZUO, Z.; WU, C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. **Food Control** v. 62, p. 270–276, 2016.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. 5. ed. Blucher, 2017. 535 p.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239–241, 1965.

DAVIES, M. E; PARROT, T.; BROWN, D.C.; RODAS, B.Z.D.; JOHNWON, Z.B.; MAXWELL, C.V.; REHBERHER, T. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 6, p.1459-1467, 2008.

DECLOUR, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **National Institutes of Health**, v. 1749, n. 5, p. 808-816, 2009.

DIAS, M.R.; CAVICCHIOLI, V.Q.; CAMARGO, A.C.; LANNA, F.G.P.A.; PINTO, P.S. de A.; BERSOT, L.D.S.; NERO, L.A. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1084–1091, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2126-3>.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to

antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p. 569-573, 2009.

DUMAS, M. D.; POLSON, S. W.; RITTER, D.; RAVEL, J.; GELB, J.; WOMMAC, K. E. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

EFSA. European Food Safety Authority. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. 2015. Disponível em: <
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2015.4036>>. Acesso em: 27 de junho de 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v. 16, n. 12, p. 5500, 2018.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Salmonella*** [Online]. Disponível em:
<http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016a.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – *Salmonella* nomenclature** [Online]. Disponível em:
<http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016b.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Approved lists of Bacterial Names** [Online]. Disponível em:
<http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016c.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 789–794, 2012.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p.4273–4279, 2011.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.D.L.; MANFILO, G.P. - Biorremediação - aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos; **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GONG, J.; ZHANG, J.; XU, M.; ZHU, C.; YU, Y.; LIU, X.; KELLY, P.; XU, B.; WANG, C. Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry *Salmonella* isolates in China (2006 to 2012). **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, p. 687–693. 2014.

GRIMONT, P.A.D and WEILL, F.-X., **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, Institut Pasteur, Paris, 2007. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/salmoms/WKLM_En.pdf>. Acesso em: 24 de junho de 2019.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). ***Salmonella in domestic animals***. New York: CABI Publishing, cap.1, p.1-17, 2000.

HE, L.; LILI, W.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**, v. 161 p. 321-326, 2006.

HILAL-DANDAN, R. and BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2008.

HONG, H. A.; HONG DUC, L.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.

HOSSAIN, M.M.; BEGUM, M.; KIM, I.-S. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinární Medicína**, v. 60, p.77- 86, 2015.

<https://doi.org/10.4148/2378-5977.7123>

HUNTER, J.C. and FRANCOIS WATKINS, L.K. **Salmonellosis (nontyphoidal) in CDC Yellow Book 2018: Health information for international Travel**. 2018. Disponível em: <<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/salmonellosis-nontyphoidal>>. Acesso em 9 de outubro de 2018.

HUR, J.; JAWALE, C. and LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v.45, p. 819–830, 2012.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGETIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I. and WEILL, F.X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, n.7, p. 526-530. 2014.
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>> <PMid:25049166>.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAE, M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Influence of *Salmonella* enteric Serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p. 745-747, 2012.

KIM, S.; KANG, H.-W.; WOO, G.-J. Prevalence of CTX-M-15 extended-Spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* isolated from chicken in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 661–663, 2015.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1911>.

KNAP, I.; KEHLET, A.B.; BENNEDSEN, M.; MATHIS, G.F.; HOFACRE, C.L.; LUMPKINS, B.S.; JENSEN, M.M.; RAUN, M.; and LAY, A. *Bacillus subtilis* (DSM 17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1690-1694, 2011. doi:10.3382/ps.2010-01056

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315–317, 1983.

LARRISON, E. L.; BYRD, J. A.; DAVIS, M. A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p.132-136, 2010.

LAXMINARAYAN, L.; SRIDHAR, D.; BLASER, M.; WANG, M.; WOOLHOUSE, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, v.353, n. 6302, p. 874-875, 2016.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 47, p. 106-114, 2010. doi:10.2141/jpsa.009096

LETTINI, A. A.; VO THAN, T.; MARAFIN, E.; LONGO, A.; ANTONELLO, K.; ZAVAGNIN, P.; BARCO, L.; MANCIN, M.; CIBIN, V.; MORINI, M.; DANG THI SAO, M.; NGUYEN THI, T.; PHAM TRUNG, H.; LE L, NGUYEN DUC, T.; RICCI, A. . Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility from

poultry and swine farms in central Vietnam. **Zoonoses and Public Health**, v.63, n.7, p. 569-576, 2016.

LI, R.; LAI, J.; WANG, Y.; LIU, S.; LI, Y.; LIU, K.; SHEN, J.; WU, C. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 14–18, 2013.

LINDBERG, A.A. and LE MINOR, L. Serology of *Salmonella*. **Methods in Microbiology**, v.15, p.1-64, 1984.

LOPES ASSIS, R.C.; DIAS LUNS, F. E.; CURY, M.C. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 43, n.8, p. 1459-1463, 2013.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F., "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis". **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 882-889, 2010.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático**. São Paulo: Nobel, 1977.

MARSHALL, B. M., and LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 718–733, 2011.

MAURISCHAT, S.; ROSSOW, M.; ELLERBROEK, L.; PICHNER, R.; MALORNY, B. *Salmonella* spp. prevalence and contamination risk factors in broiler and broiler meat of *Gallus gallus* in Germany and the European Union. Berl. Munch. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** v. 128, p. 3–13. 2014. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-03>.

MEHTA, H.H.; PRATER, A.G.; SHAMOO, Y. Using experimental evolution to identify druggable targets that could inhibit the evolution of antimicrobial resistance. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, p.279-286, 2018.

MEURER, R. F. P.; LEAL, P. C.; ROCHA, C. DA; BUENO, I. J. M.; MAIORKA, A. DAHLKE, F. Evaluation of the use of probiotics in diets with or without growth promoters for broiler chicks. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 12, p. 2687-2690, 2010.

NATARO, J.; BOPP, C.; FIELDS, P.; KAPER, J.; STROCKBINE, N. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.; LANDRY, M.; WARNOCK, D. **Manual of Clinical Microbiology**. 10th. Washington, DC., USA: ASM Press, p. 603–626, 2011.

NAWAZ, M. S.; ERICKSON, B. D.; KHAN, A. A.; KHAN, S. A.; POTHULURI, J. V.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; WAGNER, R. D.; CERNIGLIA, C. E. Human Health Impact and Regulatory Issues Involving Antimicrobial Resistance in the Food Animal Production Environment. **Regulatory Research Perspectives**, v.1, p.1-10, 2001.

- NGUYEN, D. T. A.; KANKI, M.; NGUYEN, P. D.; LE, H. T.; NGO, P. T.; TRAN, D. N. M.; LE, N.H.; VAN DANG, C.; KAWAI, T. and KAWAHARA, R. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC blactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 115-122, 2016.
- NISHINO, K.; NIKAI, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 834–843, 2009.
- NITIKANCHANA, S.; TOKACH, M.D.; DEROUCHÉY, J. M.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J. L.; and DRITZ, S.S. The Effect of *Bacillus* Probiotic on Growth Performance and Fecal Consistency of Growing-Finishing Pigs. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**: Vol. 0: Iss. 10, 2011.
- OH, J.K.; PAJARILLO, E.A.B.; CHAE, J.P.; KIM, I.H.; YANG, D.S.; KANG, D.-K. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella* Gallinarum. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, 2017.
- OLIVEIRA, D.R.M.S. and NÄÄS, I.A. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ADVANCES IN PRODUCTION MANAGEMENT SYSTEMS, 2012, Rhodes. **Anais...Competitive Manufacturing for Innovative Products and Services: proceedings**, Greece: International Federation for Information Processing, 2012.
- OUESLATI, W.; RJEIBI, M. R.; MHADHBI, M.; JBELI, M.; ZRELLI, S. and ETTRIQUI, A. Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). **Meat Science**, v.119, p. 154-159, 2016.
- BARROW, P.A. and METHNER, U. (Eds.), ***Salmonella in Domestic Animals***. Boston, p. 1-535, 2013.
- PALHARES, J. C. P.; KUNZ, A. (Ed.). Manejo ambiental na avicultura, 2011. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Documentos**, p. 125-152, 2011.
- PALMEIRA, A.; SANTOS, L. R.; BORSOI, A.; RODRIGUES, L. B.; CALASANS, M.; NASCIMENTO, V. P. Serovars and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. isolated from Turkey and Broiler Carcasses in Southern Brazil Between 2004 and 2006. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 19, p. 1-5, 2016.
- PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, p. 108–119, 2014.
- PARRY, C.M.; THRELFALL E.J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 531-538, 2008.

PHAC. 2014. Annual summary 2012. National Enteric Surveillance Program. Public Health Agency of Canada.

POPOFF, M.Y. and LE MINOR, L.E. Genus XXXIII *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R. and STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Ed. Volume 2. New York: Springer Science+Business. Media Inc. p. 764-799, 2005.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. 2014 annual report.

European Commission-Health and Food Safety. 2015. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2014.pdf>. Acesso em 31 de janeiro de 2017.

REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q.; MINAFRA, C.S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobiano. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.100, n.555-556, p.199-203, 2005.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RICE, L. and BONOMO, R. (2005). **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial**. Em Viclor Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine (5^a ed., pp. 441-476). Nova Iorque.

RICK, P.D. Lipopolysaccharide biosynthesis. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology**. Washington D.C., USA, p. 648-662, 1987.

ROBERTS, B. N.; BAILEY, R. H.; MCLAUGHLIN, M. R.; MILES, D. M.; RODRIGUEZ-RIVERA, L. D.; CUMMINGS, K. J.; LONERAGAN, G. H.; RANKIN, S. C.; HANSON, D. L.; LEONE, W. M.; EDRINGTON, T.S. *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility among dairy farm environmental samples collected in Texas. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.13, n. 4, p. 205-211, 2016.

ROLL, V. F. B.; DAI PRÁ, M. A.; ROLL, A. P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, p. 2257–2262, 2011.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M.; ANCIUTI, M.; LEITE, F. L.; CORRÊA, E. K.; XAVIER, E. G. X. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2650-2653, 2008.

RYAN, M. P.; O'DWYER, J. and ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed research international**, v. 2017. 2017. doi: 10.1155/2017/37821827

SALMONELLA SUBCOMMITTEE OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (1934). The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. **The Journal of hygiene**, 34(3), 333–350. doi:10.1017/s0022172400034677

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A.; FERNANDAS, S. A.; TAVECHIO, A. T.; DO AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39–42, 2000.

SCHMIDT, N.S.; SILVA, C.L.D. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467- 482, 2018.

SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, v.71, p.2125–8, 1992.

SEN, S.; INGALE, S.L.; KIM, Y.-W.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; LOHAKARE, J.; KIM, E.K.; KIM, H.S.; RYU, M.H.; KWON, I.K.; CHAE, B.J. (2011). Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1–2 to broiler diet on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in veterinary science**, v. 93, p. 264-268.

SHAH, A. H. and KOREJO, N.A. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat. **Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 2, p. 40–46, 2012.

SHEPHERD, E. M.; FAIRCHILD, B. D. Footpad dermatitis in poultry - a review. **Poultry Science**, v, 89, p. 2043–2051, 2010.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. **Mapa da Avicultura: Paraná, o Comandante Brasileiro. 2020.** Disponível em: <<https://sindiavipar.com.br/mapa-da-avicultura/>>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

SOMMER, M.O.A; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R.V.; ANDERSSON, D.I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p. 689-696, 2017.

STRINGFELLOW, K.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, A.; CAREY, J.; KESSLER, K.; MCREYNOLDS, J.; BELL, A.; STIPANOVIC, J.; FARNELL, M. Pasteurization of chicken litter with steam and quicklime to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 380-386, 2010.

SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T.; SUSANA, I.W.R. Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and

its utilization as a feed ingrediente for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 28, n. 2, p. 231-238, 2015.

TAVARES, L. P.; RIBEIRO, K. C. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v.9, n. 1, p. 79-88, 2007.

TENOVER, F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American **Journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S9, 2006.

THAMES, C. H.; PRUDEN, A.; JAMES, R. E.; RAY, P. P. and KNOWLTON, K. F. Excretion of antibiotic resistance genes by dairy calves fed milk replacers with varying doses of antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.139, 2012.

THUNG, T.Y.; MAHYUDIN, N.A.; BASRI, D.F.; WAN MOHAMED RADZI, C.W.J.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1888-1893, 2016. <https://doi.org/10.3382/ps/pew144>.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. and CASE, C.L. - **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre, Artmed, p. 934, 2012.

TUYTTENS, F.; VANHONACKERW, F.; VERBEKE, W. Broiler production in Flanders, Belgium: Current situation and producers' opinions about animal welfare. **World's Poultry Science Journal**, v, 70, p.343– 354, 2014.

USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade**. 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 15 junho de 2019.

USDA/FSIS. FSIS Directive. ***Salmonella* and *Campylobacter* verification program for raw meat and poultry products**. 2013.

VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E.E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.P.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, S. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1350-1352, 2017.

VAN WANGENBERG, C. P. A.; BROUWER, F. M.; HOSTE, R.; RAU LEI, M. L. **Comparative analysis of EU Standards in food safety, environment, animal welfare and other non-trade concerns with some selected countries**. 2012.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THÉWIS, A. *Salmonella* in Chicken: Current and Developing Strategies to Reduce Contamination at Farm Level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774–785, 2010.

VINUEZA BURGOS, C. V. ***Salmonella* and *Campylobacter* in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador.** Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium, 2017.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P. & BACK, A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, p. 433-441, 2015. DOI:10.3382/ps/peu081

WANG, Y.; CHO, J.H.; CHEN, Y.J.; YOO, J.S.; HUANG, Y.; KIM, H.J.; KIM, I.H. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. **Livestock Science**, v. 120, p. 35-42, 2009.

WANGEN, D.R.B.; PENA, P. R. A.; CAMARGO, A.P.F.; SANTOS, M. S.; PIRES, M. R. Emprego de inoculante à base de micro-organismos na compostagem de cama de aviário, **Enciclopédia biosfera**, v. 9, p. 1268, 2013.

WERLE, G.; LOVATO, M.; WILSMANN, C. G.; GAZONI, F. G.; CHAVES, B. W.; BRUSTOLIN, J. M. Avaliação microbiológica da cama de frangos de corte tratada com Ecodryaves. **Anais...** 25ª Jornada Acadêmica Integrada.UFSM, 2010.

WHO. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 3rd revision. 2012. Disponível em: <
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77376/9789241504485_eng.pdf;jsessionid=C382C56A7E6EC8888314E151B0C9E388?sequence=1>. Acesso em: 28 de junho de 2019.

WILKINSON, K. G.; TEE, E.; TOMKINS, R. B.; HEPWORTH, G.; PREMIER, R. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. **Poultry Science**, v. 90, p. 10–18, 2011.

YILDIRIM, Y.; GONULALAN, Z.; PAMUK, S. and ERTAS, N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. **Food Research International**, v.44, p. 725-728, 2011.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A[®] adicionado na cama frente a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* sp. durante o alojamento de frangos de corte.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar e quantificar *Salmonella* sp. em amostras de cama de aviário, *swab* cecal, *swab* de arrasto, *swab* de caixa de transporte, água e ração;
- Confirmar e sorotipificar *Salmonella* sp. isoladas;
- Caracterizar o perfil de resistência dos isolados a antimicrobianos;
- Verificar a capacidade de produção de enzimas Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) dos isolados;
- Determinar os perfis genéticos dos isolados.

4 CAPÍTULO I – EFEITO DA ADIÇÃO DE BAC TRAT 2A® SOBRE *Salmonella* EM CAMA DE INFECTÓRIO EXPERIMENTAL

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A® adicionado na cama frente a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* sp. durante o alojamento de frangos de corte. Os experimentos foram realizados no infectório experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. O trabalho se dividiu em dois estudos, sendo utilizados 240 pintos para cada um, totalizando 480 aves. Em cada estudo, os pintos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em dois tratamentos cada. Cada tratamento foi composto por oito gaiolas (repetições simultâneas), sendo alojadas 15 aves por gaiola, totalizando 120 aves por tratamento. As camas de maravalha utilizadas nas gaiolas de ambos os estudos foram esterilizadas cinco dias antes do alojamento através de fumigação com utilização de formaldeído. No primeiro estudo (E1) os tratamentos utilizados foram: E1T1 – sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A® na cama e E1T2 – sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A® na cama. No segundo estudo (E2) os tratamentos foram: E2T1 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A® na cama e E2T2 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A®. Dois dias antes do alojamento das aves foram realizadas a pesquisa e quantificação de *Salmonella* sp. na cama de maravalha para confirmar sua ausência (E1) ou para confirmar o nível de inóculo (E2) (uma amostra por repetição para cada tratamento). No 28º dia foi realizada a coleta de amostras de cama de todas as amostras e, para as aves, foi realizada a pesquisa de *Salmonella* sp. de oito aves por repetição escolhidas aleatoriamente, totalizando 128 amostras de ceco para cada estudo. Observou-se uma redução significativa nas contagens de *Salmonella* tanto para cama ($P < 0,01$) quanto para o ceco ($P < 0,05$) no estudo 1 onde houve a aplicação do modulador biológico (E1T2) em comparação com os resultados sem o modulador (E1T1). Neste estudo 1 chamou atenção a contagem elevada de *Salmonella* sp. tanto em cama quanto em ceco, pois foram os tratamentos em que não houve a inoculação de *Salmonella* na cama, ou seja, foi uma contaminação natural, o que permitiu simular uma situação real de campo com o uso do BAC TRAT 2A®. Já com relação ao segundo estudo, esta diferença estatística não foi observada entre os tratamentos. Acredita-se que isto se deva ao fato de que o desafio gerado pelo elevado inóculo de *Salmonella* não tenha permitido a ação esperada de BAC TRAT 2A® em E2T2. Diante disso, é possível concluir que o modulador biológico teve resultados satisfatórios apenas no primeiro estudo, reduzindo o número de amostras positivas e também as contagens de *Salmonella*, tanto no o ambiente (cama de maravalha), que é o foco principal de ação do produto, mas principalmente sobre o ceco das aves, demonstrando a ação indireta de BAC TRAT 2A® na criação avícola.

Palavras-chave: Modulador biológico. Infecção experimental. Desafio sanitário.

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário avícola mundial, sendo o segundo maior produtor e líder mundial de exportação de carne de frango (USDA, 2019). Ao passo que há grande crescimento da avicultura brasileira, há também uma preocupação em manter o status sanitário da produção, tendo em vista a possível contaminação bacteriana por patógenos de importância para a saúde pública, como por exemplo *Salmonella* (ANTUNES et al., 2016).

No decorrer da vida das aves, há eliminação de altas concentrações de excretas e secreções, que, juntamente com as penas que caem, restos de ração e água, possibilitam um ambiente favorável ao estabelecimento de uma microbiota diversificada na cama de maravalha (LOPES et al., 2013). Isso faz com que haja a sobrevivência e perpetuação de patógenos como *Salmonella* sp. (WERLE et al., 2010). Desta forma, estratégias devem ser desenvolvidas com o objetivo de auxiliar na redução da carga microbiana patogênica da cama, como os tratamentos físicos e químicos (CHEN et al., 2015). Porém, na avicultura industrial atual, estes tratamentos não têm se mostrado eficientes o suficiente para minimizar o risco microbiológico e ao mesmo tempo garantir a sustentabilidade ambiental (SHEPHERD e FAIRCHILD, 2010).

Assim, torna-se necessário pesquisar e validar ferramentas que possam melhorar o equilíbrio da microbiota ambiental e reduzir a contaminação da cama dos aviários, já que este ambiente se torna o principal meio de assimilação microbiana para as aves jovens, apresentando papel fundamental no desenvolvimento sadio destas. Neste sentido, métodos biológicos como a utilização de micro-organismos competitivos e benéficos que impedem a sobrevivência microbiana vêm ganhando destaque (LARRISON et al., 2010; ROLL et al., 2008), tendo em vista que a presença de cepas bacterianas com efeito benéfico em um ambiente como a cama poderiam direcionar a formação da microbiota endógena (JURICOVA et al., 2012).

Os moduladores biológicos são um conjunto de culturas de micro-organismos utilizados com finalidade de reduzir ou até mesmo eliminar a contaminação microbiana do ambiente (GAYLARDE et al., 2005). Roll e colaboradores (2008) relataram que com a utilização de moduladores biológicos

há o favorecimento de comunidades bacterianas positivas no ambiente aviário. Adicionalmente, caso haja a ingestão destes micro-organismos presentes no ambiente tratado, pode-se esperar uma proteção às aves receptoras contra colonização por patógenos, além da melhora no desempenho dos animais (LOPES, 2017), assim como fazem os probióticos comumente adicionados à alimentação destes animais.

BAC TRAT 2A[®] é um modulador biológico ambiental à base de esporos de micro-organismos selecionados de ecossistemas naturais, juntamente com estabilizantes e veículo, apresentado na forma de pó granulado. O produto é formado com base em uma composição geral concentrada e balanceada apresentando os seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis*. Esta composição é feita através da contagem total de esporos do produto antes do uso, que deve ser maior que $2,5 \times 10^8$ UFC/g. Além dos micro-organismos, há o acréscimo de cloreto de sódio (5%), bicarbonato de sódio (10%), que auxiliam no equilíbrio iônico, além do farelo de trigo (77,5%), sendo que este funciona como veículo do produto. Os esporos presentes na composição não são patogênicos, e, quando hidratados, voltam a fase vegetativa produzindo enzimas capazes de quebrar grandes e complexas estruturas moleculares dos compostos orgânicos em unidades menores e mais simples para que possam ser consumidas e transformadas por estes em compostos mais estáveis. Não é tóxico ou corrosivo, sendo absolutamente seguro o seu uso na avicultura.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A[®] adicionado na cama frente a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* sp. durante o alojamento de frangos de corte em infectório experimental.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e período experimental

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, sendo o alojamento das aves realizado no infectório experimental

e as análises microbiológicas no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA, entre fevereiro e agosto de 2019.

4.2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 240 pintos (*Gallus gallus domesticus*) de um dia para cada estudo, totalizando 480 aves. Em cada estudo, os pintos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em dois tratamentos cada. Cada tratamento foi composto por oito gaiolas (repetições simultâneas), sendo alojadas 15 aves por gaiola, totalizando 120 aves por tratamento.

No primeiro estudo (E1) os tratamentos utilizados foram: E1T1– sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A® na cama e E1T2 – sem inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A® na cama (Tabela 1).

No segundo estudo (E2) os tratamentos foram: E2T1 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e sem inoculação de BAC TRAT A® na cama e E2T2 - com inoculação de *Salmonella* Heidelberg e com inoculação de BAC TRAT A® (Tabela 1).

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS REALIZADOS EM AMBOS OS ESTUDOS QUANTO A INOCULAÇÃO DE *Salmonella* Heidelberg E INOCULAÇÃO DE BAC TRAT 2A® NA CAMA.

Tratamento	Inoculação de BAC TRAT A® na cama	Inoculação de <i>Salmonella</i> na cama
E1T1	Não	Não
E1T2	Sim	Não
E2T1	Não	Sim
E2T2	Sim	Sim

E1T1: estudo 1 tratamento 1; E1T2: estudo 1 tratamento 2; E2T1: estudo 2 tratamento 1; E2T2: estudo 2 tratamento 2.

As aves de ambos os estudos foram alojadas em gaiolas de aço galvanizado, que foram empilhadas em quatro andares e equipadas com comedouros pendulares e bebedouros do tipo infantil até o 14º dia, sendo posteriormente substituídos por bebedouros tipo taça, mantendo-se até o 28º dia do experimento, data da eutanásia das aves. A ambiência entre os tratamentos de cada um dos estudos manteve-se a mesma e o fornecimento de água e ração foi *ad libitum*.

4.2.3 Preparo do inóculo de *Salmonella* para contaminação da cama

Para o E2, a cama foi artificialmente contaminada, sendo utilizada uma cultura de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) (LAC/SAL/KARL/55), originária de cadeia avícola. A cultura pura foi submetida a uma curva de crescimento para obtenção do inóculo na concentração aproximada de 10^{12} UFC/g de maravalha, que foi determinada através de experimentos piloto.

A inoculação de SH foi realizada na cama das aves três dias antes das mesmas serem alojadas e um dia antes da aplicação do modulador biológico, através de incorporação do inóculo juntamente com o veículo APT 1% (Água Peptonada Tamponada) (BD Difco™) na cama de maravalha.

4.2.4 Preparo da cama e inoculação do modulador biológico

As camas de maravalha dos tratamentos de ambos os estudos foram esterilizadas cinco dias antes do alojamento, através de fumigação com utilização de formaldeído.

A inoculação do BAC TRAT 2A® foi realizada de forma manual sobre as camas das gaiolas (Tabela 1) dois dias antes do alojamento das aves, sendo aplicados 2,5g/m² de cama com adição de 27,5g de farelo de trigo para facilitar o processo de espalhamento. Após esta etapa foi realizada uma aspersão de 250 mL de água sobre a superfície da cama para a ativação do produto.

4.2.5 Coleta e processamento das amostras

O resumo dos protocolos de coleta das amostras está descrito na Tabela 2. Dois dias antes do alojamento das aves foram realizadas a pesquisa e quantificação de *Salmonella* sp. na cama de maravalha para confirmar sua ausência (E1) ou para confirmar o nível de inóculo (E2) (uma amostra por repetição para cada tratamento). No 28º dia foi realizada a coleta de amostras de cama de todas as repetições e, para as aves, foi realizada a pesquisa de *Salmonella* sp. de oito aves por repetição escolhidas aleatoriamente, totalizando 128 amostras de ceco para cada estudo. Para a quantificação de *Salmonella*, foi

realizado um *pool* composto por material cecal de todas as aves de cada repetição totalizando 16 *pools* por estudo. As amostras destinadas para pesquisa eram do tipo individual e as amostras destinadas para a quantificação de *Salmonella* sp. eram do tipo *pool*.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS DENTRE OS DOIS ESTUDOS NOS DOIS TEMPOS DE COLETA, SEUS TRATAMENTOS, TIPO E NÚMERO DE AMOSTRA E UNIDADE ANALÍTICA.

Origem	Momento	Tratamento	Nº de amostras	Análise	Tipo amostra	Unidade analítica
CAMA	Dois dias antes do alojamento	E1T1	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E1T2	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E1T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E1T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E2T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E2T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
CAMA	28 dias após o alojamento	E1T1	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E1T2	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E1T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E1T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E2T1	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E2T2	8	Pesquisa	Individual	25g/amostra
		E2T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
		E2T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	25g/amostra
CECO	28 dias após o alojamento	E1T1	64	Pesquisa	Individual	<i>Swab</i> cecal
		E1T2	64	Pesquisa	Individual	<i>Swab</i> cecal
		E1T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	18,9g/ <i>pool</i>
		E1T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	18,9g/ <i>pool</i>
		E2T1	64	Pesquisa	Individual	<i>Swab</i> cecal
		E2T2	64	Pesquisa	Individual	<i>Swab</i> cecal
		E2T1	8	Quantificação	<i>Pool</i>	18,9g/ <i>pool</i>
		E2T2	8	Quantificação	<i>Pool</i>	18,9g/ <i>pool</i>

E1T1: estudo 1 tratamento 1; E1T2: estudo 1 tratamento 2; E2T1: estudo 2 tratamento 1; E2T2: estudo 2 tratamento 2.

4.2.6 Pesquisa de *Salmonella* sp.

As amostras coletadas de cama e ceco, conforme descrito no item 4.2.5 foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp. conforme metodologia 6579 da *International Standardization Organization* (ISO, 2007). As amostras, suas quantidades e unidades analíticas utilizadas para esta análise estão indicadas na Tabela 2.

Na primeira etapa, um pré-enriquecimento foi realizado e para as amostras de cama, 25g de maravalha foram pesadas em saco Whirl-Pak estéril (Nasco) com adição de 225 mL de APT 1%. Já para as amostras de ceco, foi obtido um *swab* com conteúdo cecal que foi acondicionado a tubos tipo Falcon contendo 10 mL de APT 1%. As amostras foram submetidas à incubação a 37°C por 18-21 h. Em seguida, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Muller-Kauffmann Tetrationato suplementado com novobiocina (Merck KGaA) e caldo Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone (Oxoid, CM 0866) e incubadas a 37°C e 42,5°C/24h, respectivamente. Após a incubação, as amostras foram semeadas em placas contendo os meios seletivos Xilose lisina desoxicolato Ágar - XLD (BD Difco™) e Ágar Bismuto Sulfito – BS (BD Difco™), seguidas de incubação a 36°C ± 0,5°C por 24 h.

Para a confirmação bioquímica, colônias típicas obtidas nos meios XLD e BS foram inoculadas nos ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Oxoid, CM 0277) e Lisina Ferro (LIA) (BD Difco™), ambos incubados a 36±1°C por 24±3h. Colônias com reações características para o gênero *Salmonella* sp. nestes testes, foram inoculadas nos caldos Ureia (BD Difco™), Malonato (BD Difco™), Vermelho de Metila (VM) (BD Difco™) e Voges-Proskauer (VP) (BD Difco™) e nos ágar Citrato de Simmons (BD Difco™) Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (BD Difco™) para confirmação final do gênero. Todos os tubos foram incubados a 36±1°C por 24±3h e em seguida a leitura foi realizada. Os resultados foram expressos em “Presença” ou “Ausência” de *Salmonella* sp. em 25g de cama ou “por ceco”.

4.2.7 Quantificação de *Salmonella* sp.

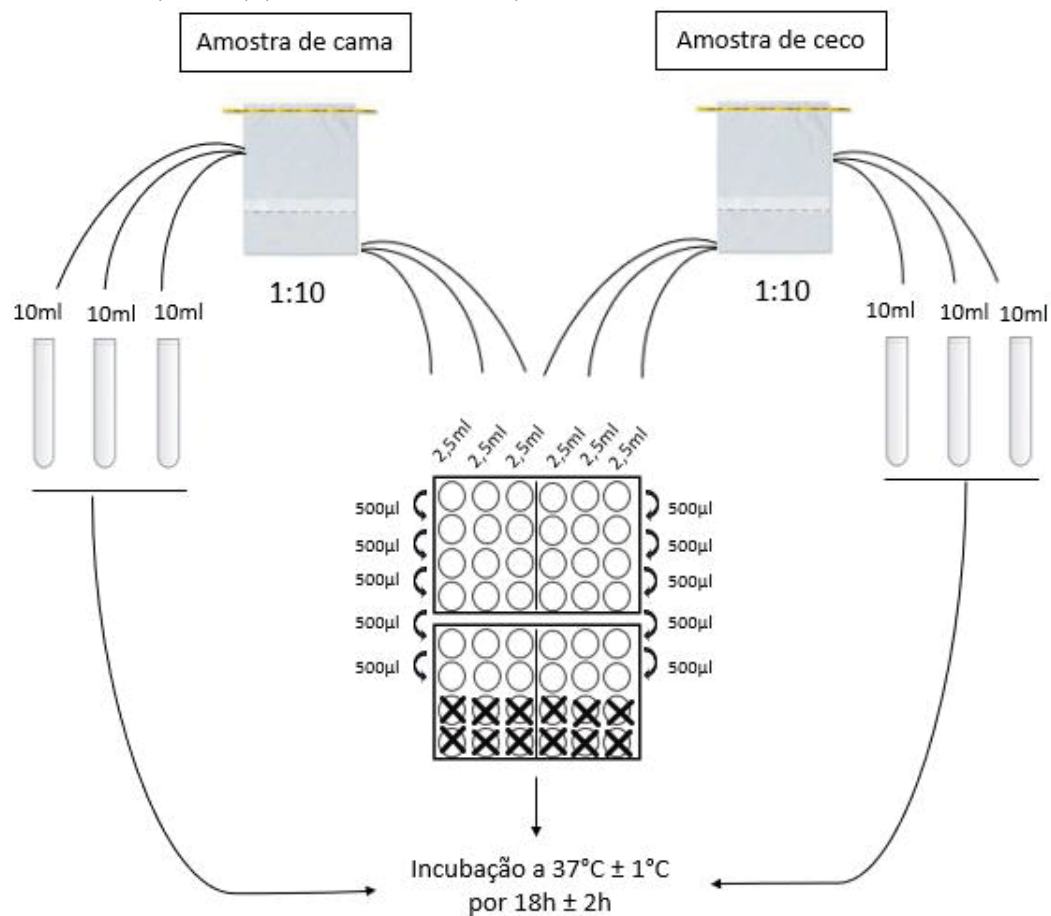
A quantificação de *Salmonella* sp. presente em cada amostra foi realizada por meio do método do Número Mais Provável miniaturizado (mNMP), (ISO/TS 6579-2:2002) com modificações. A modificação foi a implementação de uma série de diluição anterior à primeira recomendada. As amostras, suas quantidades e unidades analíticas utilizadas para esta análise estão indicadas na Tabela 2.

Para a análise das camas, alíquotas de 25g de cada repetição foram coletadas e seguidas de adição de 225 mL de APT 1%. Com relação aos cecos, fez-se a soma do peso de todos os cecos e, a partir deste valor, seguiu-se uma diluição 1:10 com APT 1%, cujo volume foi variável de acordo com o conteúdo cecal obtido em cada um dos 32 *pools* (Tabela 2). Após homogeneização inicial, três alíquotas de 10 mL foram transferidas para uma série de três tubos. Adicionalmente, 2,5 mL de cada diluição inicial foram transferidos para os três primeiros poços de uma placa de cultura de 24 poços. Em seguida, 500µL de cada um dos primeiros poços foram transferidos para poços subsequentes, os quais continham 2mL de APT 1%. O procedimento foi repetido em mais cinco diluições até a obtenção final de sete diluições (Figura 1).

Os tubos e as placas de 24 poços foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 h. Após incubação, 20µl de cada tubo e de cada poço foram transferidos para placas contendo MSRV (Rappaport-Vassiliadis Semissólido) (BD Difco™) e essas foram incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 h. Cada poço que apresentou mudança de cor de azul para branco na placa de MSRV foi considerado positivo para *Salmonella* sp. e foi estriado em ágar XLD. Placas com poços negativos após às 24 horas foram novamente incubadas por mais 24 horas adicionais. As colônias suspeitas no ágar MSRV foram semeadas em ágar XLD que foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 h. Colônias típicas de *Salmonella* sp. foram selecionadas e submetidas a confirmação bioquímica, como descrito no item 4.2.6.

De acordo com o resultado positivo de cada tubo/poço foi calculado o NMPm/g ou “por ceco”, com auxílio do MPN *Calculation Program* (2017), versão 5.

FIGURA 1 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCEDIMENTO INICIAL AO QUAL AS AMOSTRAS DE CAMA E CECO FORAM SUBMETIDAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp. DE ACORDO COM A METODOLOGIA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL MINIATURIZADO (mNMP) (ISO/TS 6579-2:2012).



4.2.8 Análise estatística

Para avaliar as influências do uso de BAC TRAT 2A[®], inoculação de *Salmonella* e suas interações sobre o NMP de *Salmonella* na cama e no ceco, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e, quando encontrada diferença a nível de $p < 0,05$, foi realizado o teste T de Tukey. Para avaliar as influências do uso de BAC TRAT 2A[®], inoculação de *Salmonella* e suas interações sobre a presença de *Salmonella* nas camas, foi realizado o teste do Chi-quadrado com correção de Bonferroni. Já para a comparação da frequência de presença de *Salmonella* nos cecos das aves entre os tratamentos do primeiro estudo e entre os tratamentos do segundo estudo, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, sendo

considerado significativo quando o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS versão 23 (IBM, 2015).

4.2.9 Aspectos éticos

O protocolo experimental utilizado nesta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR - Universidade Federal do Paraná (CEUA/Palotina) sob o protocolo nº 33/2018.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens (Log NMP/g) de *Salmonella* sp. na cama e no ceco obtidas dos quatro tratamentos estão descritas na Tabela 3. Observou-se uma redução significativa nas contagens de *Salmonella* na cama, tanto no estudo 1 ($P < 0,01$) quanto no estudo 2 ($P < 0,05$), nos tratamentos em que houve aplicação do modulador biológico em comparação aos tratamentos sem o modulador. Com relação a contagem do patógeno nos cecos, não foi observada diferença estatística significativa em nenhum dos dois estudos.

Ainda, o estudo 1 chamou atenção pela contagem elevada de *Salmonella* sp. tanto em cama quanto em ceco, pois foram os tratamentos em que não houve a inoculação de *Salmonella* na cama, ou seja, foi uma contaminação natural, o que permitiu simular uma situação real de campo com o uso do BAC TRAT 2A®.

O método utilizado para a quantificação do patógeno (Número Mais Provável - NMP) produz resultados estimados da população bacteriana com base em probabilidade estatística, assumindo-se que o número verdadeiro de organismos presentes em uma amostra está entre os limites que se supõe ser 95%. Desta forma, a tabulação de NMP representa uma faixa estimada e não os valores absolutos (PEELER e MCCLURE, 1992).

TABELA 3 – MÉDIA E SIGNIFICÂNCIA DA QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* POR LOG NMP/G NAS CAMAS E CECOS DE TODOS OS TRATAMENTOS.

Tratamento	CAMA		CECO	
	Média (Log NMP/g)	Significância	Média (Log NMP/g)	Significância
E1T1	2,88	0,003**	0,94	0,198 ^{ns}
E1T2	0,07		0,49	
E2T1	4,74	0,047*	0,49	0,379 ^{ns}
E2T2	3,47		0,26	

E1T1: estudo 1 tratamento 1; E1T2: estudo 1 tratamento 2; E2T1: estudo 2 tratamento 1; E2T2: estudo 2 tratamento 2.

* - significativo a 5%; ** - significativo a 1%; ns - não significativo

Na Tabela 4, observa-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) somente entre os cecos dos tratamentos do E1, em que houve a simulação de uma situação real, sem a inoculação de *Salmonella* na cama, porém, com aplicação de BAC TRAT 2A®, o que demonstra a eficácia da inoculação do produto na cama.

A ação antibacteriana dos moduladores biológicos pode ser atribuída à exclusão por competição ou também pela produção de enzimas extracelulares produzidas pelo complexo bacteriano, destacando-se a alfa-amilase, celulase, metaloproteases, proteases, hemicelulase, fitase, dentre outras (AHMED et al., 2014; LEE et al., 2010, PAN e YU, 2014; SUPRYIATI et al., 2015).

TABELA 4 - ANÁLISE QUALITATIVA DE *Salmonella* EM CAMA E CECO PARA TODOS OS TRATAMENTOS.

Tratamento	CAMA		CECO	
	Nº de amostras positivas/total	Significância	Nº de amostras positivas/total	Significância
E1T1	8/8	0,055 ^{ns}	28/64	0,005**
E1T2	5/8		12/64	
E2T1	8/8	ns	42/64	0,583 ^{ns}
E2T2	8/8		46/64	

E1T1: estudo 1 tratamento 1; E1T2: estudo 1 tratamento 2; E2T1: estudo 2 tratamento 1; E2T2: estudo 2 tratamento 2.

ns - não significativo; ** - significativo a 1%

Corroborando o presente trabalho, Roll et al. (2008) relataram que a ingestão de micro-organismos utilizados como moduladores biológicos presentes na cama de aviário, promove uma proteção às aves receptoras contra

colonização por patógenos, favorecem a colonização de bactérias benéficas no ambiente do aviário e melhoram o desempenho dos animais, a exemplo do que fazem os probióticos. Estes mesmos autores demonstraram um decréscimo nas contagens de enterobactérias e melhoria da qualidade da cama sob o aspecto microbiológico com o uso de BAC TRAT 2A®. Além disso, o uso deste tipo de produto na cama de aviário foi avaliado por Cruz et al. (2013), que verificaram a ausência de impactos do complexo bacteriano utilizado na cama, bem como no desempenho das aves. Um aspecto adicional é a otimização da atividade microbiana do meio, assim como a melhora dos índices de degradação orgânica dos resíduos, quando realizada a compostagem juntamente com os compostos bacilares aplicados na cama. (SUPRYIATI et al., 2015). Visto que são poucos os dados disponíveis na literatura relatando a utilização de micro-organismos benéficos em cama que tenham ação probiótica, os resultados encontrados no presente estudo podem estar relacionados principalmente às atividades do complexo bacilar testado, como a liberação de substâncias antibacterianas e competição por substratos do meio com ações favoráveis à adaptação e manutenção no meio, citando-se a cooperação, a competição e a liberação de substâncias para a inibição de diferentes micro-organismos nas camas de aviário (LOPES, 2017; MENCONI et al., 2011, NADELL et al., 2016).

Bacillus licheniformis, uma das espécies que compõe o modulador biológico utilizado neste estudo, está diretamente ligada à produção de bacteriocinas, que são moléculas de potente efeito antimicrobiano contra alguns tipos de micro-organismos que competem por substratos nas camas de aviário (ABRIOUEL et al., 2011; AHMED et al., 2014). *B. subtilis* está relacionada com a produção de enzimas proteases responsáveis pela redução na contagem de enterobactérias após 24 horas de contato, mostrando sua ação benéfica em camas de aviário (BRITO e TAGLIARI, 2007).

No estudo de Knap et al. (2011), a utilização de *B. subtilis* em aves infectadas com *Salmonella* Heidelberg mostrou que o uso deste microrganismo probiótico reduziu significativamente a carga de SH tanto no trato gastrointestinal das aves quanto no ambiente. Ainda, em experimento realizado no Paraná com utilização de probiótico à base de *B. subtilis* por via oral e desafiados com *S. Heidelberg*, Hayashi et al. (2018) obtiveram reduções significativas nas contagens de *Salmonella* no ceco das aves aos 21 dias de idade. A exclusão

competitiva foi o principal mecanismo para a efetividade das reduções encontradas já que *B. subtilis* ocupa locais de adesão nas membranas dos enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas que são geralmente usadas por *Salmonella*, impedindo assim a adesão do patógeno e seu estabelecimento no intestino (SALMINEN et al., 1996).

No presente trabalho, não foram avaliados parâmetros de performance dos animais, como consumo e ganho de peso, porém, em alguns experimentos em que foi realizada inoculação via oral de um inóculo consideravelmente elevado (10^7 UFC/ave) de *S. Heidelberg* nas aves, não foram observadas perdas de performance (BERGER e PARKER, 1970; HAYASHI et al., 2018). Contudo, o que foi observado nesses e em outros estudos foi um aumento da performance dos animais que ingeriram esporos de *B. subtilis* (HARRINGTON et al., 2015; REN et al. 2013; SHIVARAMAIAH et al., 2011).

4.4 CONCLUSÕES

Diante do exposto, é possível concluir que o modulador biológico teve resultados positivos em ambos os estudos. Houve redução nas contagens de *Salmonella* nas amostras de cama, foco principal do produto, em E1 e E2 e também redução do número de amostras positivas para o patógeno, apenas no primeiro estudo, principalmente nas amostras de ceco das aves, demonstrando a ação indireta de BAC TRAT 2A® na criação avícola.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.; NABIL, O.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Review**, v. 35, p. 201-232, 2011.
- AHMED, S. T.; ISLAM, M.; MUN, H. S.; SIM, H. J.; KIM, Y.; YANG, C. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-1971, 2014.
- ANTUNES, P.; MOURAO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.
- BERGER, H.W. and PARKER F.L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. **Science**, v. 168, p. 1345-1347, 1970.
doi:10.1126/science.168.3937.1345
- BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Efeito da utilização de Impact-P® na ocorrência de celulite em frangos de corte. **Hora Veterinária**, v. 26, p.13-20, 2007.
- CHEN, Z.; WANG, H.; JIANG, X. Developing a two-step heat treatment for inactivating desiccation adapted *Salmonella* spp. in aged chicken litter. **Foodborne Pathogens Disease**, v 12, p.104–109, 2015.
- CRUZ, D. P.; OTUTUMI, L. K.; JUNIOR, R. P.; CERVANTES, R. P.; MEZALIRA, T. S.; GERÔNIMO, E. Performance, carcass yield and litter quality of broilers raised on litters treated with microorganisms. **Ciência animal Brasileira**, v. 14, p.41-48, 2013.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.D.L.; MANFILO, G.P. Biorremediação - aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos; **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.
- HARRINGTON, D.; SIMS, M.; KEHLET, A.B. Effect of *Bacillus subtilis* supplementation in low energy diets on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 25, n. 1, p. 29-39, 2015.
- HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; KRAIESKI, A.L.; ARAUJO, R.B.; GONZALEZ-ESQUERRA, R.; LEONARDECZ, E.; DA CUNHA, A.F.; CARAZZOLLE, M.F.; MONZANI, P.S.; SANTIN, E. Effect of feeding *Bacillus subtilis* spores to broilers challenged with *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Brazilian Strain UFPR1 on performance, immune response, and gut health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 13, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00013>
- IBM Corp. Lançado em 2015. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/TS 6579-2:2002 (E): horizontal method for the enumeration of *Salmonella* by a miniaturized MPN technique.** Geneva: ISO (2002).

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAE, M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Influence of *Salmonella* enteric Serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p. 745-747, 2012.

KNAP, I.; KEHLET, A.B.; BENNEDSEN, M.; MATHIS, G.F.; HOFACRE, C.L.; LUMPKINS, B.S.; JENSEN, M.M.; RAUN, M.; LAY, A. *Bacillus subtilis* (DSM 17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1690-1694, 2011.

LARRISON, E. L.; BYRD, J. A.; DAVIS, M. A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p.132-136, 2010.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S. and SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 47, p. 106-114, 2010.

LOPES, M.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. L. et al. Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. **Poultry Science**, v. 92, p.638-644, 2013.

LOPES, MICHELLE. Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológico sobre características de camas aviárias na produção de frangos de corte. **Dissertação**. Pelotas. 2017

MENCONI, A.; MORGAN, M.J.; PUMFORD, N.R.; HARGIS, B.M. and TELLEZ, G. Physiological properties and *Salmonella* growth inhibition of probiotic *Bacillus* strains isolated from environmental and poultry sources. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/958408>

NADELL, C. D.; KNUT, D.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 589-600, 2016.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, p. 108–119, 2014.

PEELER, J.T.; MCCLURE, F.D. Appendix 2. Most Probable Number Determination. In: **Bacteriological Analytical Manual**, GARTHRIGHT, W.E. 7th ed., Appendix 2, FDA, Washington D.C. 1992.

REN, D.Y.; LI, C.; QIN, Y.Q.; YIN, R.L.; DU, S.W.; YE, F.; LIU, H.F.; WANG, M.P.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M. Y.; JIN, N.Y. Lactobacilli reduce chemokine IL-8 production in response to TNF- α and *Salmonella* challenge of Caco-2 cells. **Biomed Research International**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/925219

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M.; ANCIUTI, M.; LEITE, F. L.; CORRÊA, E. K.; XAVIER, E. G. X. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2650-2653, 2008.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347–358, 1996. doi:10.1007/BF00395941

SHEPHERD, E. M.; FAIRCHILD, B. D. Footpad dermatitis in poultry - a review. **Poultry Science**, v. 89, p. 2043–2051, 2010.

SHIVARAMAIAH, S.; PUMFORD, N.R.; MORGAN, M.J.; WOLFENDEN, R.E.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HARGIS, B.M.; TÉLLEZ, G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. **Poultry Science**, v. 90, p. 1574-1580, 2011. doi:10.3382/ps.2010-00745

SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T.; SUSANA, I.W.R. Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 28, n. 2, p. 231-238, 2015.

USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2019.

WERLE, G.; LOVATO, M.; WILSMANN, C. G.; GAZONI, F. G.; CHAVES, B. W.; BRUSTOLIN, J. M. Avaliação microbiológica da cama de frangos de corte tratada com Ecodryaves. **Anais... 25ª Jornada Acadêmica Integrada.UFSM**, 2010.

5 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA FOODS

Modulador biológico BAC TRAT 2A® exerceu bom desempenho no controle de *Salmonella* sp. em ambiente de produção e trato digestório de frangos de corte

Bruna Gabriela Gheller Kaefer^{1*}, Thiago Henrique Bellé¹, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos¹, Jeferson Luiz Richter², Geraldo Camilo Alberton¹, Vinicius Cunha Barcellos¹, Cibeli Viana¹ and Luciano dos Santos Bersot¹

¹ Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Departamento de Ciências Veterinárias, Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água, Palotina – PR, Brazil; brunaggheller@hotmail.com (B.G.G.K.); thiago-belle@hotmail.com (T.H.B.); emanoellisantos1@gmail.com (E.A.R.D.S.); alberton@ufpr.br (G.C.A.); vcbarcellos@ufpr.br (V.C.B.); lucianobersot@gmail.com (L.D.S.B.).

² Biotecnal Soluções Ambientais Toledo – PR, Brazil; pesquisadesenvolvimento@biotecnal.ind.br

* Correspondence: brunaggheller@hotmail.com

Received: date; Accepted: date; Published: date

Resumo: Métodos biológicos como a utilização de micro-organismos competitivos e benéficos que impedem a sobrevivência microbiana vêm ganhando destaque na avicultura, com intuito de se reduzir a contaminação por patógenos de importância no setor, como *Salmonella* sp. Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A® sob a redução de contagem de *Salmonella* sp. na cama de maravalha e no trato gastrintestinal de frangos de corte sob condições reais de alojamento sujeito à infecção natural pelo patógeno, e avaliar o perfil genotípico e fenotípico dos isolados obtidos. O experimento foi realizado entre março de 2018 e agosto de 2019, no estado do Paraná. O estudo foi composto por dois barracões, sendo que a cama utilizada no barracão 1 foi o controle negativo (C) e a cama do barracão 2 foi o tratamento (T), sendo tratada com o modulador biológico BAC TRAT 2A®. O desempenho do modulador biológico BAC TRAT 2A® foi positivo para a diminuição do desafio sanitário envolvendo a presença de *Salmonella* sp. durante a criação de aves. Tanto no ambiente quanto no ceco das aves houve uma diminuição da carga do patógeno, principalmente nos estágios finais do ciclo de criação, possivelmente provocada pela exclusão competitiva na cama do aviário e modulação biológica da microbiota das aves em contato com o produto.

Palavras-chave: modulador biológico; avicultura; desafio sanitário; salmonelose.

5.1 Introdução

O Brasil destaca-se no cenário da avicultura mundial por ser o maior produtor e o segundo maior exportador de carne de frango do mundo, responsável por 14% da produção mundial no ano de 2018 [1]. Para que o país ocupe esta posição, faz-se necessária a manutenção do status sanitário do plantel nacional e o controle de patógenos como *Salmonella*, principal causa de diarreia bacteriana em humanos, com uma estimativa mundial de 153 milhões de casos e 57 mil mortes anualmente [2].

Na produção de frangos de corte são várias as fontes de contaminação das aves por *Salmonella* no campo e uma delas é a cama, geralmente composta por maravalha, sendo que há também a presença de penas, restos de ração e água, além de acúmulo de excretas e secreções das aves. Assim, uma microbiota diversificada proveniente do trato digestório dos animais se estabelece neste ambiente, cujo potencial patogênico pode variar de acordo com a sanidade das aves e as práticas de manejo ambiental [3].

Como prática frequente na avicultura, a cama é reutilizada com o propósito sustentável e redução de custos [4,5], o que pode dificultar a desinfecção do ambiente, afetando a qualidade microbiológica do sistema de produção, provocando na cama alterações em sua atividade de água, pH, temperatura, umidade e presença de amônia [6]. Essas condições contribuem para a prevalência e disseminação de micro-organismos no ambiente, como *Salmonella* sp., com possibilidade das aves de lotes subsequentes se contaminarem e aumentar o risco de disseminação ao longo do abate, comprometendo a inocuidade do produto final, além de possível contaminação da água e do solo [7,8].

Com o intuito de se reduzir esta contaminação, métodos biológicos como a utilização de micro-organismos competitivos e benéficos que impedem a sobrevivência microbiana vêm ganhando destaque na avicultura [9,10]. Considerando que a microbiota da ave é formada a partir do contato com micro-organismos presentes no ambiente, a presença de uma cepa bacteriana com efeito benéfico em um ambiente como a cama poderia direcionar a formação da microbiota endógena [11], além de inviabilizar o desenvolvimento e a sobrevivência de bactérias patogênicas no ambiente [12].

Um exemplo da utilização biotecnológica de micro-organismos são os moduladores biológicos, utilizados com a finalidade de reduzir ou até mesmo eliminar a contaminação microbiológica do ambiente [13]. O modulador geralmente é composto por micro-organismos que também são utilizados como probióticos, fungos filamentosos, leveduras e principalmente bactérias [14]. A ação antibacteriana dos moduladores biológicos pode ser atribuída à exclusão por competição, em que duas espécies com nichos ecológicos parecidos não podem coexistir, devido a pressão evolutiva exercida pela competição [15], ou também pela produção de enzimas extracelulares produzidas pelo complexo bacteriano, destacando-se a alfa-amilase, celulase, metaloproteases, proteases, hemicelulase, fitase, dentre outras [16,17].

BAC TRAT 2A® é um modulador biológico ambiental à base de esporos de micro-organismos selecionados de ecossistemas naturais, juntamente com estabilizantes e veículo, apresentado na forma de pó granulado. O produto é formado com base em uma composição geral concentrada e balanceada que engloba os seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis*. Esta composição é feita através da contagem total de esporos, que deve ser maior que $2,5 \times 10^8$ UFC/g de produto. Além dos micro-organismos, há o acréscimo de cloreto de sódio (5%), bicarbonato de sódio (10%) e farelo de trigo (77,5%), sendo que este último funciona como veículo do produto. Os esporos presentes na composição não são patogênicos, e, quando hidratados, voltam a fase vegetativa produzindo enzimas capazes de quebrar estruturas moleculares grandes e complexas dos compostos orgânicos em unidades menores e mais simples para que possam ser consumidas e transformadas pelos micro-organismos em compostos mais estáveis. Não é tóxico ou corrosivo, sendo absolutamente seguro o seu uso na avicultura.

Os micro-organismos bacilares constituintes do modulador biológico testado produzem bacteriocinas, como a barnase, subtilina e mersacidina, as quais demonstram capacidade de inibir o crescimento de certos patógenos que competem por substratos nas camas de aviário, como *Salmonella* sp. [16,18,19]. Devido à ação antibacteriana destes produtos, acredita-se que o uso de moduladores possa ser uma ferramenta útil na estratégia de redução do uso dos antimicrobianos na avicultura. Tendo em vista a crescente preocupação com o uso extensivo e indiscriminado de antimicrobianos e a emergência de micro-organismos resistentes aos mesmos, é fundamental a adoção de medidas que visam minimizar seu uso na produção animal. Portanto, os objetivos

deste estudo foram avaliar o efeito do modulador biológico BAC TRAT 2A® sob a redução de contagem de *Salmonella* sp. na cama de maravalha e no trato gastrointestinal de frangos de corte sob condições reais de alojamento sujeito à infecção natural pelo patógeno, e avaliar o perfil genotípico e fenotípico dos isolados obtidos.

5.2. Materiais e Métodos

O protocolo experimental utilizado nesta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR - Universidade Federal do Paraná (CEUA/Palotina) sob o protocolo nº 33/2018.

5.2.1. Local e período experimental

O experimento foi realizado entre março de 2018 e agosto de 2019, sendo conduzido em uma propriedade avícola situada no estado do Paraná, constituída por quatro barracões do tipo modal para criação de frangos de corte. As avaliações microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA/UFPR e a análise de PFGE foi realizada na UFV – Universidade Federal de Viçosa.

5.2.2. Delineamento experimental

O estudo foi composto por dois barracões que, após passarem por vazio sanitário de 21 dias, receberam cama nova, ou seja, de primeiro uso, que foi distribuída uma semana antes do alojamento das aves. A cama utilizada no barracão 1 não recebeu tratamento algum e foi considerada o Controle Negativo (C) e a cama do barracão 2 foi tratada com o modulador biológico BAC TRAT 2A® sendo considerada o tratamento (T) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados para a realização do experimento.

Tratamento	Barracão	BAC TRAT	
		2A® na cama	Descrição
C	1	Não	Cama sem inoculação de BAC TRAT 2A®
T	2	Sim	Cama com inoculação de BAC TRAT 2A®

C: controle; T: tratamento

O estudo teve duração de 55 dias, que foi o tempo em que as aves ficaram alojadas nos barracões. Cada barracão foi registrado como um lote distinto e os dois receberam a mesma lotação de acordo com o porte. O experimento se deu em condições especiais de alimentação das aves, com utilização de uma ração sem utilização de promotores de crescimento.

5.2.3. Inoculação do modulador biológico

A inoculação do produto foi realizada após a distribuição da maravalha, dois dias antes do alojamento das aves, em toda a área dos barracões que receberam o tratamento, com auxílio de maquinário específico, sendo aplicados 2,5g do modulador biológico por metro quadrado de cama. Na área do pinteiro, a aplicação foi na quantidade de 5g do produto por metro quadrado de cama. Após esta etapa, a cama foi umedecida com água livre de desinfetantes para a ativação do produto, através do sistema de nebulização dos aviários e por bomba pulverizadora costal.

5.2.4. Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas amostras de cama de maravalha (n = 84), swab de arrasto (n = 20), swab cecal (n = 80), ração (n = 8), água (n = 8), swab de caixa de transporte (n = 20), além de pool de ceco (n = 2) e pool de cama (n = 2), totalizando 224 amostras. Estas amostras foram coletadas em seis tempos: D0 (antes do alojamento das aves), D7 (sete dias após o alojamento), D21 (21 dias após o alojamento), D35 (35 dias após o alojamento), D47 (47 dias após o alojamento) e DC (chegada das aves ao abatedouro). A descrição das amostras e o método de análise microbiológica estão detalhados na Tabela 2.

Foram realizadas análises de pesquisa e quantificação de *Salmonella* sp. Para as amostras de cama, swab cecal, swab de arrasto, swab de caixa de transporte, ração e água foram realizadas apenas análises de pesquisa de *Salmonella* sp. Já para as amostras em pool, tanto de cama quanto de ceco, foram realizadas somente análises de quantificação de *Salmonella* sp. (Tabela 2).

Para as amostras de cama, pool de cama e ração, foram coletadas 25 gramas do material correspondente; para as amostras de água, 25 mL de material; para as amostras de pool de ceco, o conteúdo presente nos cecos foi extraído, pesado e adicionado de APT na proporção de 1:10; para as amostras de swab cecal, um swab estéril com conteúdo cecal foi utilizado; para as amostras de caixa de transporte, utilizou-se uma esponja e um molde de 10 x 10 cm e para as amostras de swab de arrasto foram utilizados propés estéreis.

Tabela 2. Descrição dos tempos de coleta e amostras coletadas em cada tempo.

Amostra	N	Quantificação (NMP/g)	Pesquisa (Ausência /Presença)	Unidade Analítica	Volume de APT	Tempo de coleta					
						D0	D7	D21	D35	D47	DC
Cama	84		X	25g	225mL	X	X	X	X	X	
Pool de cama	2	X		25g							X
Swab cecal	80		X	Swab	10mL		X	X	X	X	
Pool de ceco	2	X		*	*						X
Ração	8		X	25g	225mL		X	X	X	X	
Água	8		X	25mL	225mL		X	X	X	X	
Swab de caixa	20		X	100 cm ²	180mL						X
Swab de arrasto	20		X	Propé	180mL		X	X	X	X	

D0: Antes do alojamento das aves; D7: sete dias após o alojamento; D21: 21 dias após o alojamento; D35: 35 dias após o alojamento; D47: 47 dias após o alojamento; DC: chegada das aves ao abatedouro. * O volume do conteúdo cecal era variável e a adição de APT era realizada na proporção 1:10.

5.2.5. Pesquisa de *Salmonella* sp.

As amostras coletadas foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp. conforme metodologia 6579-1 da International Standardization Organization [20]. As amostras utilizadas para esta análise estão indicadas na Tabela 2.

Um pré-enriquecimento foi realizado utilizando-se volumes variados de água peptonada tamponada a 1% (APT, BD Difco™) de acordo com o tipo de amostra conforme indicado na

Tabela 2. Para as amostras de cama, ração e água, 25g ou mL foram acondicionados a sacos Whirl-Pak estéreis (Nasco) e complementados com 225 mL de APT. Aos swabs de arrasto (propé hidratado com 20 mL de APT) e swabs de caixa de transporte (esponja hidratada com 20 mL de APT) foram complementados com 180 mL de APT para cada amostra. Para as amostras de ceco, um swab com conteúdo cecal foi obtido com a utilização de zaragatoa e acondicionado em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de APT. Todas as amostras foram submetidas à incubação a 37°C por 18-21 h. Em seguida, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Muller-Kauffmann Tetrationato suplementado com novobiocina (Merck) e caldo Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone (Oxoid,) e incubadas a 37°C e 42,5°C/24h, respectivamente. Após a incubação, as amostras foram semeadas em Xilose lisina desoxicolato Ágar - XLD (BD Difco™) e Ágar Bismuto Sulfito – BS (BD Difco™), seguidas de incubação a 37°C ± 0,5°C por 24 h.

Para a confirmação bioquímica, colônias típicas foram inoculadas nos ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Oxoid) e Lisina Ferro (LIA) (BD Difco™), ambos incubados a 37±1°C por 24±3h. Isolados com reações características para o gênero *Salmonella* sp. nestes testes, foram inoculadas nos caldos Ureia (BD Difco™), Malonato (BD Difco™), Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (MRVP) (BD Difco™) e nos ágar Citrato de Simmons (BD Difco™) e Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (BD Difco™). Todos os tubos foram incubados a 37±1°C por 24±3h e em seguida a leitura foi realizada.

Isolados com características bioquímicas compatíveis com o gênero *Salmonella* sp. foram purificados em ágar Verde Brilhante (BG) (BD Difco™) e depois submetidos ao teste de aglutinação em placa com antissoro polivalente OMA (Bio-Rad Laboratories, Inc., França). Os resultados foram expressos em “Presença” ou “Ausência” de *Salmonella* sp. em 25g ou mL por tipo de amostra, por propé avaliado ou a cada 100cm² no caso das caixas de transporte.

5.2.6. Quantificação de *Salmonella* sp.

A quantificação de *Salmonella* sp. presente em cada amostra foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com a International Standardization Organization [21], com adaptações.

Para a análise das camas, foram coletadas amostras de maravalha e foram realizadas três diluições. A primeira consistiu em três pesagens de 10g seguidas de adição com 90 mL de APT. Na segunda diluição, foram realizadas três pesagens de 1g que foram diluídas em 9 mL de APT. Na terceira diluição, foram feitas três pesagens de 1g, seguidas da adição de 9 mL de solução salina 0,85% (SS) com semeadura de 1 mL para três tubos contendo 9 mL de APT. Cada um dos 9 tubos foi considerado uma análise individual e o isolamento e identificação seguiu conforme descrito no item 2.5.

Para os cecos, após a extração do conteúdo cecal, o conteúdo foi pesado e três alíquotas foram adicionadas a tubos contendo APT, seguindo a proporção 1:10, de acordo com a quantidade em gramas obtida. Após esta primeira diluição, uma segunda diluição foi realizada, transferindo-se 1 mL de cada um dos três tubos para outros três contendo 9 mL de APT. Uma terceira diluição foi realizada, transferindo-se novamente 1 mL da segunda diluição para três tubos contendo 1 mL de APT. Da mesma forma que para as amostras de cama, cada um dos 9 tubos foi considerado uma análise individual e o isolamento e identificação seguiu conforme item 2.5.

Pela combinação do número de tubos positivos em cada uma das diluições e os valores encontrados foram convertidos em número de *Salmonella*/grama de amostra, com auxílio do MPN Calculation Program (2017), versão 5. A sensibilidade do método, nas condições realizadas foi de <0,3 NMP/g.

5.2.7. Sorotipificação

Para esta análise, um isolado de cada categoria de amostra foi selecionado (swab cecal, pool de ceco, pool de cama, cama e swab de arrasto). A sorotipificação desses isolados de *Salmonella*

sp. foi realizada com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) de acordo com o sistema Kauffmann-White, realizada pelo Laboratório de Enterobactérias (Labent) do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

5.2.8. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados utilizados nesta análise foram selecionados com base no sorovar identificado após o resultado da sorotipificação e também de acordo com o grupo (C ou T) dentro de cada categoria de amostra (cama, pool de cama, swab cecal, pool de ceco e swab de arrasto). O teste foi realizado de acordo com o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para disco-difusão em ágar [22]. Como controle do teste foi utilizada uma cepa pan suscetível de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Os isolados foram testados frente a seis classes de antimicrobianos: (1) Beta-lactâmicos: Ampicilina – AMP (10 µg), Cefepime – CPM (30 µg), Ceftriaxone – CRO (30 µg), Meropenem – MER (10 µg), Imipenem – IPM (10 µg), Aztreonam – ATM (30 µg) e Amoxicilina com Ácido Clavulânico – AMC (20/10 µg); (2) Aminoglicosídeos: Gentamicina – GEN (10 µg), Amicacina – AMI (30 µg) e Tobramicina – TOB (10 µg); (3) Tetraciclina: Tetraciclina – TET (30 µg) e Doxiciclina – DOX (30 µg); (4) Quinolonas: Ácido Nalidíxico – NAL (30 µg) e Ciprofloxacina – CIP (5 µg); (5) Inibidores do Folato: Sulfametoxazol com Trimetoprim – SUT (23,75/1,25 µg); (6) Cloranfenicol: CLO (30 µg).

5.2.9. Detecção de *Salmonella* produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Após uma triagem para detecção fenotípica de ESBL, realizada através do método de disco-difusão, o teste confirmatório para ESBL foi utilizado para as culturas que apresentaram halos de inibição de Ceftadizima e Cefotaxima menores do que 22 e 21 mm, respectivamente [23].

O teste fenotípico confirmatório foi realizado por meio do método de disco-difusão dupla. Para isso, foi aplicado um disco central contendo a combinação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico – AMC (20/10 µg) (Cecon®). Em um raio de 20mm a partir do disco central foram aplicados três discos, dois de cefalosporinas de terceira geração (Ceftazidima – CAZ – 30 µg e Cefotaxima – CTX – 30 µg) e uma cefalosporina de quarta geração (Cefepima – CPM – 30 µg). O controle do teste foi realizado com uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922. Foram considerados positivos para produção de enzimas ESBL os isolados de *Salmonella* sp. que apresentaram zonas de inibição em torno de qualquer cefalosporina aumentadas na direção do disco com Amoxicilina e Ácido Clavulânico [23].

5.2.10. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi realizada em isolados escolhidos de acordo com os sorovares mais frequentes encontrados na sorotipificação. A realização da PFGE seguiu o protocolo PulseNet (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, USA) descrito por Ribot et al. [24] com algumas modificações.

Os isolados de *Salmonella* sp. foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C por 18 horas. Após esse período, ajustou-se a densidade óptica de cada caldo para aproximadamente 1 ($\lambda=610\text{nm}$) e uma alíquota de 400 µl da suspensão ajustada foi transferida para microtubo e centrifugada a $12.000 \times g$ por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi tratado com proteinase K (20 mg/ml da concentração final; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para depois ser misturado com 400 µl de agarose a baixo ponto de fusão (1%; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e formar os plugs. Após a solidificação, os plugs foram transferidos para tubos de 5 mL contendo tampão para lise celular (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) e 25 µL de proteinase K e incubados a 55°C por uma hora e meia. Os plugs foram lavados com água mili Q e TE buffer e armazenados até a realização da digestão enzimática.

Para a digestão enzimática, cerca de 1/3 do plug original foi seccionado e depositado em microtubos de 1,5 ml contendo 173 µl de buffer e 50 U da enzima XbaI (Promega Corp., Madison, WI, USA), seguido de incubação a 37°C por 2 horas.

O equipamento CHEFDR III (Bio-Rad) foi utilizado para a corrida dos géis, nos seguintes parâmetros: tempo de transição inicial de 2,2s, tempo de transição final de 63,8s, voltagem de 6 V/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 18 horas. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X e a temperatura durante a corrida do gel foi mantida em 14°C. Como marcador de peso molecular foi utilizada a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Braenderup (ATCC® BAA664).

Após a eletroforese, os géis foram corados em banho de imersão por 30 minutos com GelRed (Biotium), submetidos a lavagens com água destilada e os padrões de banda foram detectados utilizando-se um transiluminador sob luz ultravioleta.

Os resultados foram documentados utilizando um transiluminador sob luz ultravioleta e os padrões de restrição obtidos por PFGE foram analisados usando o software BioNumerics versão 6.6 (Applied-Maths, Ghent, Belgium). Para gerar o dendrograma, o padrão de bandas foi comparado usando o coeficiente de similaridade de Dice a 1,5%, tolerância de 5%, e análise de clusters UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Para interpretação dos resultados, perfis com similaridade igual ou acima de 95% foram alocados em um mesmo cluster e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais.

5.2.11. Análise estatística

Para avaliar as influências do uso de BAC TRAT 2A®, dias de coleta e suas interações sobre a presença de *Salmonella* nas amostras, foi realizado o teste do Chi-quadrado com correção de Bonferroni e quando encontrada diferença a nível de $p < 0,05$, foi realizado o teste T de Tukey. As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS versão 23 [25].

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Eficácia do modulador

O primeiro tempo de coleta (D0) teve por finalidade avaliar as condições microbiológicas da cama de ambos os grupos antes do alojamento das aves, porém já com o produto aplicado no grupo tratamento. Tanto o controle quanto o tratamento apresentaram resultados negativos para *Salmonella* sp. Do mesmo modo, as análises de pesquisa de *Salmonella* sp. realizadas aos 7 dias de alojamento das aves (D7) e na chegada ao abatedouro (DC) foram todas negativas.

Nos demais tempos (D21, D35 e D47), conforme Tabela 3, foi possível detectar a presença de *Salmonella* sp. em maior percentual nas amostras do controle (33,6%) em relação ao tratamento (23,6%), (Tabela 3). Destaque especial para as amostras de swab cecal, em que as aves oriundas do controle apresentaram 12 amostras positivas (30%) enquanto o tratamento teve apenas uma amostra positiva para *Salmonella* sp. (2,5%). Ficou perceptível que o produto aplicado na cama exerceu influência na modulação de *Salmonella* no trato gastrointestinal (TGI) das aves. Roll et al. [10] afirmam que se espera uma proteção contra a colonização por patógenos caso as aves ingiram estes micro-organismos presentes na cama, bem como melhora no desempenho dos animais, como ocorre na ingestão dos probióticos comumente adicionados à alimentação.

Os micro-organismos, quando vivem em comunidade, desenvolvem diversas ações para sua adaptação e manutenção no meio, dentre elas a cooperação, competição e liberação de substâncias, podendo inibir outros micro-organismos nas camas de aviário [26]. Poucos são os dados disponíveis na literatura que justifiquem os bons resultados obtidos com a utilização do modulador biológico na cama, porém, acredita-se que a influência do complexo bacilar testado se baseie na competição por substratos do meio, bem como a liberação de substâncias antibacterianas [27,28].

Com relação às amostras de água e ração, todas se mostraram livres de *Salmonella*, o que garante sua exclusão como fonte de contaminação para as aves. As amostras de swab de caixa de transporte também foram todas negativas para o patógeno (Tabela 3).

Tabela 3. Número de resultados positivos e negativos dentre o total de amostras coletadas para a análise de pesquisa de *Salmonella* sp.

AMOSTRA	(C)	(T)
Swab de Arrasto (n=20)	5/10	5/10
Cama aviário (n=84)	20/42	20/42
Swab cecal (n=80)	12/40	1/40
Swab Cx. Transporte (n=20)	0/10	0/10
Ração (n=8)	0/4	0/4
Água (n=8)	0/4	0/4
TOTAL (N=220)	37/110 (33,6%)	26/110 (23,6%)

C: controle; T: tratamento.

Segundo Cressman et al. [29], a cama tem grande influência no estabelecimento da microbiota intestinal, pois, em estudo comparando camas novas com camas reutilizadas, as camas novas continham mais bactérias ambientais e as aves criadas nestas camas abrigaram estas bactérias. Por outro lado, camas reutilizadas continham mais bactérias de origem intestinal e as aves criadas sob estas camas foram amplamente colonizadas por estes micro-organismos. Sendo assim, a administração de micro-organismos na cama que atuem como probióticos e tenham ação moduladora na microbiota intestinal nos primeiros dias de vida das aves é de fundamental importância.

O fator tempo de alojamento também exerceu influência no aumento de ocorrência de *Salmonella* sp. Na avaliação do efeito do dia de coleta sobre a presença de *Salmonella* sp. tanto no controle quanto no tratamento observou-se diferença significativa entre os dias de coleta ($P > 0,05$), havendo um aumento na presença do patógeno nos tempos D35 e D47 em relação ao tempo D21 (Tabela 4). Este resultado pode estar relacionado com a excreção intermitente do patógeno e com o acúmulo de matéria orgânica no meio em que as aves vivem [30]. Os tempos de coleta D0, D7 e DC não foram comparados com os outros tempos, pois nestes tempos não se obtiveram amostras positivas.

Ainda na Tabela 4, quando são comparados os resultados entre os grupos controle e tratamento, o único tempo que apresentou diferença significativa com a aplicação do modulador biológico foi D35 ($P > 0,05$), não havendo diferença estatística entre os grupos nos tempos D21 e D47.

Tabela 4. Comparação apenas entre as amostras positivas para *Salmonella* sp. provenientes de swab cecal, swab de arrasto e cama, entre os grupos controle e tratamento de acordo com o dia de coleta (n=132).

Tratamento	D21	D35	D47
C	2 ^{Aa}	21 ^{Ab}	14 ^{Ab}
T	4 ^{Aa}	11 ^{Bb}	11 ^{Ab}

C: controle; T: tratamento.

Médias seguidas de letras diferentes (maiúscula na coluna e minúscula na linha) diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao analisar separadamente as amostras de swab cecal, cama e swab de arrasto independente dos tempos de coleta (D21, D35 e D47), pode-se observar que somente nas amostras de swab cecal é que houve diferença estatística significativa entre os grupos C e T (Tabela 5). Tal resultado sugere que houve influência do modulador biológico e, possivelmente através da exclusão competitiva, interferência na excreção do patógeno pelas aves. Em experimento realizado no Paraná com utilização de probiótico à base de *B. subtilis* por via oral e aves desafiadas com *S. Heidelberg*, Hayashi et al. [31] obtiveram reduções significativas nas contagens de *Salmonella* no ceco das aves. A exclusão competitiva foi o principal mecanismo para a efetividade das reduções encontradas, já que *B. subtilis* ocupa locais de adesão nas membranas dos enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas que são geralmente usadas por *Salmonella*, impedindo a adesão do patógeno e seu estabelecimento no intestino [32].

Tabela 5. Efeito da origem da amostra (swab cecal, cama e swab de arrasto) sobre a presença de *Salmonella* nos dias de coleta 21, 35 e 47 (n=132).

Swab cecal		Cama		Swab de arrasto	
C	T	C	T	C	T
12 ^a	1 ^b	20 ^a	20 ^a	5 ^a	5 ^a

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas, diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste de Tukey. A análise foi realizada para cada tipo de amostra individualmente.

Com relação à quantificação, realizada através dos pools de cama e ceco aos 47 dias de vida das aves (D47), a contagem de *Salmonella* sp. foi expressivamente maior no controle em relação ao tratamento, chegando a uma relação de contagem pelo menos 120 vezes maior no pool de ceco do grupo controle em relação ao tratamento. Com relação ao pool de cama, esta relação foi um pouco menor, mas ainda o grupo controle teve no mínimo 26 vezes mais contagem do patógeno. Este dado, especialmente do pool de ceco permite uma análise do grau de contaminação que pode ter sido levada para dentro do abatedouro (Tabela 6).

Tabela 6. Média da quantificação de *Salmonella* sp. em pool de cama e pool de ceco das aves.

AMOSTRA	T	C	RELAÇÃO
	NMP/g	NMP/g	C/T
Pool de cama	4,3	>110	>26x
Pool de ceco	0,92	>110	>120x

C: controle; T: tratamento.

5.3.2. Sorotipificação

Dentre os 344 isolados no total desta pesquisa, 89 foram sorotipificados e estes foram provenientes de amostras de cama, swab cecal, pool de cama, swab de arrasto e pool de ceco. Estes dados estão apresentados de forma agrupada, onde “Cama” englobou os dados de cama, pool de cama e swab de arrasto e “Ceco” agrupou os dados de pool de ceco e swab cecal (Tabela 7).

Dentre os isolados enviados para a análise, 16 sorovares diferentes foram identificados, sendo os sorovares *S. enterica* subesp. *enterica* (O:4,5) e (O:4,5:i:-), que são considerados variantes monofásicos de *Salmonella* Typhimurium os mais prevalentes, com 35 isolados (39,32%), seguidos de *S. Saint Paul*, com 14 isolados (15,73%) e *S. Agona* e *S. Typhimurium*, ambos com 10 isolados cada (11,23%) (Tabela 7).

A sorotipificação é realizada com base na variabilidade antigênica de lipopolissacarídeos (antígeno O), proteínas flagelares (antígeno H) e, em alguns casos, polissacarídeos capsulares (antígeno Vi). As proteínas flagelares são codificadas por dois diferentes genes flagelares, *fliC* que

codifica a primeira fase flagelar e *fljB*, que codifica a segunda fase flagelar. A maioria dos sorovares de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* passa pelas duas fases alternadamente. Porém, algumas cepas podem não passar pela primeira ou pela segunda fase ou ambas, resultando em sorovares monofásicos [33], como *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (O:4,5) e (O:4,5:i:-).

Tabela 7. Sorovares de *Salmonella* identificados na pesquisa de acordo com as amostras de onde foram coletados.

SOROVAR	CAMA	CECO
<i>Salmonella</i> O:4,5 (variante monofásica de <i>S. Typhimurium</i>)	25	7
<i>Salmonella</i> O:4,5:i:- (variante monofásica de <i>S. Typhimurium</i>)	2	1
<i>Salmonella</i> SaintPaul	12	2
<i>Salmonella</i> Agona	3	7
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10	0
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	0
<i>Salmonella</i> Seftenberg	3	1
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (cepa rugosa)	1	1
<i>Salmonella</i> Cubana	0	2
<i>Salmonella</i> Derby	1	0
<i>Salmonella</i> Minnesota	2	0
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (O:16)	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (O:3,10:eh:-)	0	1
<i>Salmonella</i> Anatum	0	1
<i>Salmonella</i> Cerro	1	0
<i>Salmonella</i> Havana	1	0
TOTAL	66	23

O surgimento destes sorovares, conhecidos como “*Salmonella*-Typhimurium-like”, que são monovariantes de *S. Typhimurium*, se deu na metade dos anos 1990 na Europa [34,35] e durante os últimos anos, eles tem sido cada vez mais reportados e o risco para a saúde pública associado a estes sorovares têm aumentado. Assim, a detecção e caracterização destes sorovares é de grande importância [36]. Em estudo avaliando frangos no oeste do Paraná, Perin et al. [37] também detectaram grande frequência de *S. Typhimurium*, com 43% de todos os isolados sorotipificados.

Trabalho similar foi realizado por Velasquez et al. [38] em granjas avícolas nos Estados Unidos, em que foram avaliadas amostras de swab de arrasto, swab cloacal e amostras de cama. Foram identificados seis diferentes sorovares, sendo *S. Enteritidis* (52%) e *S. Berta* (38%) os mais prevalentes. Fagbamila et al. [39] na Nigéria, detectaram 82 sorovares diferentes de *Salmonella* sp. provenientes de amostras de cama, poeira, fezes, ração e água em cadeia avícola. Destes, os mais frequentemente encontrados foram *S. Kentucky* (16,2%), *S. Poona* (5,6%) e *S. Elisabethville* (5%). Ainda, no trabalho realizado por Vinuesa-Burgos et al. [40] no Equador, em que foram avaliados 70 isolados provenientes de cadeia avícola, incluindo swab cecal, o sorovar de *Salmonella* mais frequente foi *S. Infantis* (94%).

Em pesquisa realizada entre os anos de 2009 e 2010, Voss-Rech et al. [41] analisaram 1.543 amostras provenientes de swab ambiental de criação de aves em três estados do Brasil e, destas, 82 cepas de *Salmonella* sp. foram isoladas e 15 sorovares foram identificados, sendo os mais comuns Minnesota, Infantis, Heidelberg, Senftenberg e Mbandaka. *S. Minnesota* foi o sorovar mais frequente no estado do Mato Grosso do Sul (86,8%), dentre os cinco que foram encontrados. No Paraná, 13 sorovares foram identificados, sendo *S. Infantis* o mais prevalente (34,5%). Já em Santa Catarina, dentre os 10 sorovares encontrados, *S. Senftenberg* foi o mais comum (33,3%). Ainda, como no presente estudo, foram encontradas cepas identificadas apenas como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* e que apresentaram as seguintes fórmulas antigênicas: O:4,5:-:1,2 (2,44%); O:13,23:i:- (1,22%); O:4,5 (1,22%); e O:9,12 (1,22%).

O que se pode notar é uma grande diferença regional na distribuição dos sorovares no Brasil mostrando a existência de uma variação temporal e geográfica na distribuição dos sorovares de *Salmonella* sp. Até o início dos anos 2000, o sorovar mais frequentemente descrito em amostras de carne de frango no Brasil era *S. Enteritidis*, chegando a percentuais de até 84%, fato que ocorreu após o controle dos sorovares Pullorum e Gallinarum [42–45]. Nos anos seguintes, *S. Enteritidis* começou a ser menos isolada no país, dado mostrado por Kottwitz et al. [46], que descreveu a queda de 77% de isolados deste sorovar em 2006 para 9% em 2010. Isto deveu-se principalmente à implantação de Programas Nacionais de controle de *Salmonella* sp., especialmente o PNSA, que determinou o abate de matrizes portadoras de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e a vacinação de lotes de aves reprodutoras contra *S. Enteritidis* [47]. Com esses sorovares sob controle, novos sorovares encontraram condições favoráveis para sua sobrevivência e manutenção no ambiente avícola [46].

O conhecimento dos sorovares circulantes representa uma importante ferramenta epidemiológica em qualquer país. Embora a maioria das cepas seja potencialmente patogênica para os humanos, algumas são mais frequentemente encontradas nas aves [48]. Além do mais, a sorotipificação das cepas provenientes da cadeia avícola é importante para estimar a contaminação cruzada e explorar as relações entre a bactéria, o meio ambiente e as carcaças dos animais [49].

5.3.3. Resistência antimicrobiana

Dentre os 67 isolados de *Salmonella* sp. submetidos à análise de resistência antimicrobiana, selecionados com base no sorovar e também de acordo com o grupo (C ou T) dentro de cada categoria de amostra (cama, pool de cama, swab cecal, pool de ceco e swab de arrasto), todos foram resistentes à pelo menos dois antibióticos. Destes, cinco (7,5%) isolados foram resistentes à uma classe de antimicrobianos, três (4,5%) foram resistentes à duas classes, 54 (80,6%) resistentes à três classes e cinco (7,5%) resistentes à quatro classes dentre os antimicrobianos testados (Tabela 8).

Tabela 8. Fenótipos de resistência dos 67 isolados de *Salmonella* sp. frente às classes de antimicrobianos testados.

CLASSES DE ANTIMICROBIANOS	NÚMERO DE ISOLADOS	%
Quinolonas	5	7,5%
Tetraciclina, quinolonas	1	1,5%
Beta lactâmicos, quinolonas	2	3,0%
Beta lactâmicos, tetraciclina, quinolonas	53	79,1%
Beta lactâmicos, quinolonas, cloranfenicol	1	1,5%
Beta lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas	3	4,5%
Beta lactâmicos, tetraciclina, quinolonas, inibidores do folato	2	3,0%

Desta forma, 88% (59/67) dos isolados mostraram-se multirresistentes (MR), ou seja, apresentaram resistência à três ou mais classes de antimicrobianos. Resultados similares, variando a MR entre 86 e 96,8% também foram encontrados em ambiente de abate de frango no Paraná [37,50,51]. A detecção de cepas de *Salmonella* sp. resistentes a vários antibióticos tem se tornado comum e é agravada com a ampla utilização destes produtos em rações animais, principalmente como aditivos promotores de crescimento [52].

Estudos recentes de diferentes países revelam que isolados de *Salmonella* sp. provenientes de alimentos de origem animal, principalmente da carne de aves, apresentam elevados índices

de multirresistência à antimicrobianos [53–55]. Estes resultados mostram um problema mundial enfrentado há cerca de três décadas e que vêm aumentando a cada ano. Entre 2007 e 2011 foi realizada uma pesquisa no Brasil com 12.582 cepas de *Salmonella* sp., que apontou o crescimento exponencial de cepas com perfis multirresistentes, incluindo as cefalosporinas de amplo espectro, além do aumento do número de sorovares com este perfil [56]. Isso é resultado da utilização indiscriminada destes antibióticos, o que potencializa o perigo da salmonelose para a saúde pública pois a circulação destas cepas na cadeia alimentar influencia negativamente na terapêutica de casos graves da doença no ser humano [57].

Desta forma, assim como neste estudo, deve se monitorar constantemente a prevalência e resistência de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de aves e também nos alimentos para que se possibilite a adoção de medidas para mitigar problemas, devido às implicações para saúde pública através da disseminação de micro-organismos resistentes à múltiplas drogas. Adicionalmente, é necessário que haja cautela e responsabilidade no uso de antimicrobianos na medicina veterinária e na medicina humana [58].

Quase todos os isolados (66) foram sensíveis aos carbapenêmicos meropenem e imipenem, ambos com 98,5% de sensibilidade (Figura 1). O fato de apenas um isolado apresentar resistência ao imipenem e da mesma forma apenas um ao meropenem é um resultado importante, pois estes são agentes de primeira escolha no tratamento de infecções humanas causadas por micro-organismos produtores de enzimas ESBL. Esta resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos, mesmo que baixa, é um alerta à saúde pública, tendo em vista a elevada taxa de mortalidade devido a estes micro-organismos e ao reduzido número de opções terapêuticas [59,60].

Com relação aos aminoglicosídeos amicacina e tobramicina, 100% dos isolados foram sensíveis aos dois antimicrobianos (Figura 1). Ammar et al. [61], no Egito, também encontraram 100% de suscetibilidade de cepas de *Salmonella* isoladas de frangos à amicacina. Outro antibiótico pertencente à mesma classe, gentamicina, teve apenas 2 (3%) isolados apresentando resistência, resultado similar ao encontrado por Abatcha et al. [53] e Doménech et al. [62].

Na presente pesquisa, os maiores índices de resistência dos isolados foram observados para o ácido nalidíxico (100%), cefotaxima (91%), amoxicilina com ácido clavulânico (87%), doxiciclina (87%), ampicilina (86,5%), ceftadizima (86,5%), tetraciclina (85%), ceftriaxona (83,5%) e aztreonam (83,5%) (Figura 1). Resultados condizentes foram relatados por Vinueza-Burgos et al. [63], que encontraram 100% dos isolados de *Salmonella* sp. provenientes da cadeia avícola resistentes ao ácido nalidíxico, 99% à cefotaxima, 99% à ampicilina e 94% à tetraciclina. Zhu et al. [55] também relataram percentuais semelhantes, sendo que 99,5% dos isolados de *Salmonella* sp. foram resistentes ao ácido nalidíxico e 87,8% à ampicilina.

Dentre os isolados de *Salmonella* sp. que apresentaram maior nível de resistência aos antimicrobianos, a classe dos beta-lactâmicos foi a que mais se destacou, sendo que 91% dos isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos da classe e 85% a pelo menos três agentes beta-lactâmicos. A resistência à esta classe é atribuída à alguns mecanismos como a modificação do sítio alvo da droga, inativação pela enzima beta-lactamase ou inacessibilidade da droga ao seu sítio alvo de ação [64]. A resistência aos beta-lactâmicos encontrada neste estudo é preocupante, pois foi observada elevada resistência às penicilinas e principalmente às cefalosporinas de terceira e quarta geração (Figura 1), que são medicamentos considerados críticos no tratamento de salmonelose humana [57]. Neste sentido, a circulação de cepas resistentes a estes medicamentos é um ponto importante de controle na cadeia alimentar, pois constituem uma ameaça à saúde pública [65].

Thai et al. [66] relataram que o ácido nalidíxico tem resistência predominante em aves e este dado corrobora outros estudos com os mesmos achados [67–69]. Nos últimos anos o que tem sido observado é um aumento na resistência e este antibiótico, sendo resultado de um processo multifatorial, que inclui dentre as possibilidades as mutações e a resistência mediada por plasmídeos [70]. Em 1996, a resistência ao ácido nalidíxico era encontrada em 0,4% das cepas de

Salmonella sp. isoladas de carne de aves, em 2008 em aproximadamente 60% e atualmente 95% das cepas são resistentes a este antimicrobiano [63,71–73].

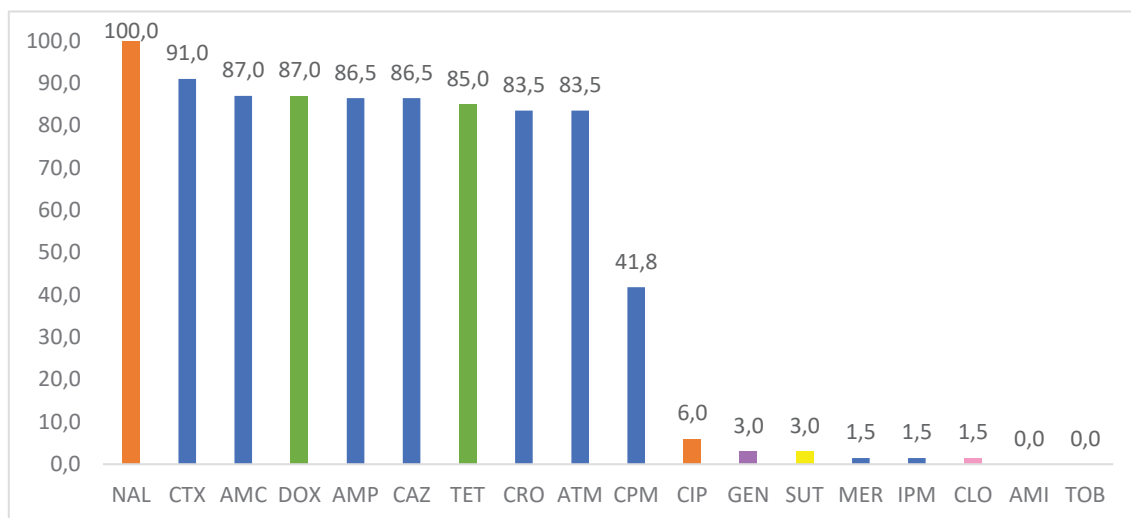


Figura 1. Percentual de isolados de *Salmonella* sp. resistentes a cada agente antimicrobiano testado. NAL: Ácido Nalidíxico; CTX: Cefotaxima; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; DOX: Doxiciclina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftadizima; TET: Tetraciclina; CRO: Ceftriaxone; ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; CLO: Cloranfenicol; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina.

O perfil mais prevalente entre os isolados multirresistentes foi a resistência a Ampicilina (AMP), Ceftriaxona (CRO), Aztreonam (ATM), Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AMC), Tetraciclina (TET), Doxiciclina (DOX), Ácido Nalidíxico (NAL), Ceftadizima (CAZ) e Cefotaxima (CTX), observado em 25 isolados (37,3%) (Tabela 9).

Dos 67 isolados, 58 (86,6%) apresentaram resistência à ceftazidima ou à cefotaxima ou a ambos e no teste confirmatório fenotípico para produção de enzimas ESBL, 34 isolados (50,7%) apresentaram padrão compatível (Apêndice A). Dentre os isolados que apresentaram resultado fenotípico positivo para a produção de enzimas ESBL, os mais frequentemente encontrados foram *S. enterica* subesp. *enterica* (O:4,5) com 13 isolados, *S. SaintPaul* e *S. Typhimurium* ambos com 5 isolados e *S. Agona* com 4 isolados.

Tabela 9. Fenótipos de resistência dos 67 isolados de *Salmonella* sp. obtidos de cadeia avícola frente aos antimicrobianos testados.

Fenótipo de resistência	Número de isolados	%
NAL	4	6,0
NAL, CIP	1	1,5
NAL, CTX	1	1,5
CPM, NAL	1	1,5
NAL, CLO, CTX	1	1,5
DOX, NAL, CTX	1	1,5
AMP, AMC, NAL, CIP, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CRO, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CRO, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	25	37,3
AMP, CRO, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, SUT, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CPM, CRO, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	22	32,8
AMP, CRO, ATM, AMC, GEN, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CRO, MER, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CPM, CRO, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CIP, CAZ, CTX	2	3,0
AMP, CPM, CRO, IPM, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CPM, CRO, ATM, AMC, GEN, TET, DOX, NAL, CAZ, CTX	1	1,5
AMP, CPM, CRO, ATM, AMC, TET, DOX, NAL, SUT, CAZ, CTX	1	1,5

NAL: Ácido Nalidíxico; CTX: Cefotaxima; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; DOX: Doxiciclina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftadizima; TET: Tetraciclina; CRO: Ceftriaxone; ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; CLO: Cloranfenicol; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina.

5.3.4. Perfil de macrorrestrrição dos isolados

Os perfis de macrorrestrrição dos 31 isolados analisados estão apresentados nas Figura 2, 3 e 4.

Na Figura 2, considerando os parâmetros UPGMA adotados, os isolados de *S. Typhimurium* e de seus monovariantes [*S. enterica* subesp. *enterica* (O:4,5) e *S. enterica* subesp. *enterica* (O:4,5:i:-)] foram agrupados em 2 clusters. Uma das cepas não foi agrupada em nenhum cluster (non clustered - NC).

O cluster A agrupou a maioria dos isolados provenientes do grupo controle, e foram oriundos de amostras de cama, pool de ceco, swab de arrasto e swab cecal. Nesse cluster foi possível observar a presença de um único isolado do pulsotipo “A3” e outros 2 pulsotipos diferentes com 100% de similaridade entre si, “A1” com 2 isolados e “A2” com 11 isolados. O cluster B agrupou apenas isolados do grupo tratamento, em que todos apresentaram 100% de similaridade entre si, formando apenas um pulsotipo (B1), sendo provenientes de amostras de swab de arrasto e cama. Apesar de possuírem padrões de macrorrestrrição altamente semelhantes, é interessante observar que os isolados de *Salmonella* Typhimurium, bem como suas variantes, provenientes do grupo controle foram agrupados em cluster diferente do isolados provenientes do grupo tratamento, evidenciando diferenciação no padrão dos isolados entre os grupos, fato que não se repetiu nos demais sorovares avaliados.

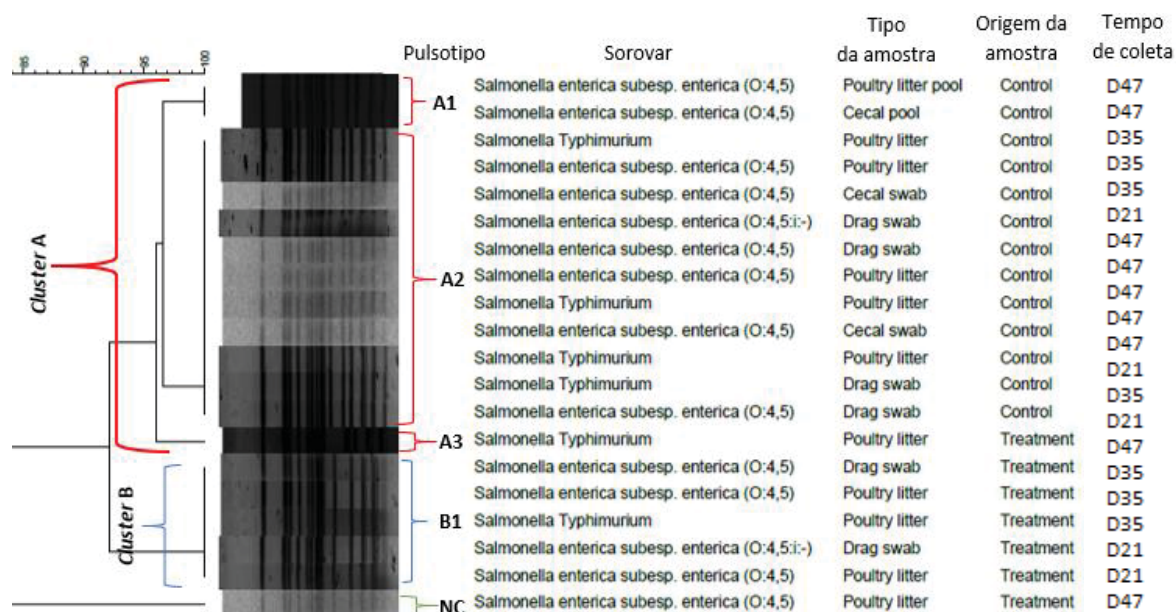


Figura 2. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de 20 padrões únicos de cepas de *Salmonella* Typhimurium e suas monovariantes isoladas de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada usando o coeficiente de similaridade de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered.

Na Figura 3 os isolados foram agrupados em dois clusters e seis pulsotipos. O cluster C foi composto por três isolados pertencentes aos grupos controle e tratamento e foram de amostras de swab cecal e cama. Neste cluster foi possível observar um único isolado do pulsotipo "C2" e dois isolados com 100% de similaridade entre si, constituindo o pulsotipo "C1". O cluster D foi composto por dois isolados que constituíram dois diferentes pulsotipos, "D1" e "D2", sendo amostras de swab de arrasto e cama provenientes do grupo tratamento. Os outros isolados não formaram clusters (NC).

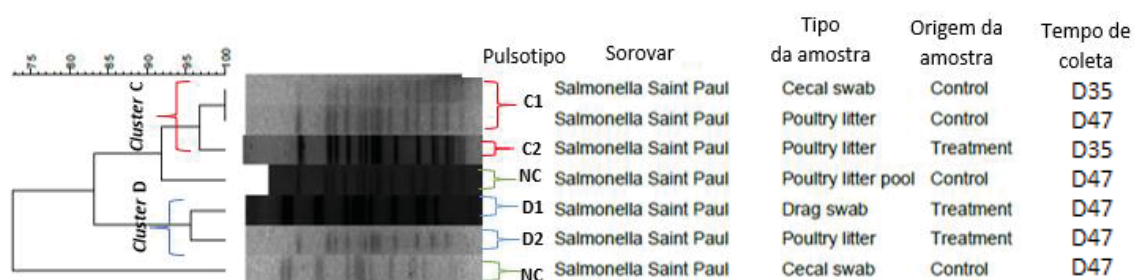


Figura 3. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de sete padrões únicos de cepas de *Salmonella* SaintPaul de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered

Na Figura 4, as cepas de *S. Agona* foram agrupadas em apenas 1 cluster (E), que foi composto por três isolados provenientes de amostras de cama, swab de arrasto e pool de ceco, tanto do grupo controle quanto do tratamento. Este cluster foi constituído de dois pulsotipos (E1 e E2). Apenas um isolado não formou cluster (NC).

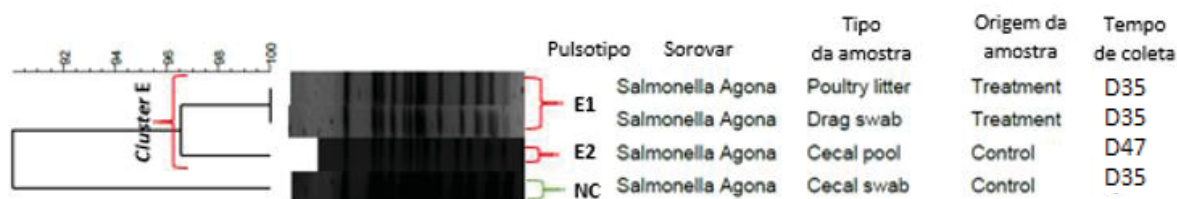


Figura 4. Representação esquemática (padrão, pulsotipo, sorovar, tipo e origem da amostra e tempo de coleta) de três padrões únicos de cepas de *Salmonella Agona* de cadeia avícola no estado do Paraná. A macrorrestrição foi realizada com XbaI e a identificação foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (tolerância de 5%). NC: non-clustered.

Através da observação da presença de perfis clonais idênticos ou com elevado grau de similaridade em amostras, grupos (controle e tratamento) e tempo distintos, o perfil de macrorrestrição dos isolados desta pesquisa mostrou que há uma distribuição das cepas do campo, que se perpetuam por toda a criação e também ao longo do tempo.

5.4. Conclusões

Diante dos dados apresentados, pode-se concluir que o desempenho do modulador biológico BAC TRAT 2A® foi positivo para a diminuição do desafio sanitário envolvendo a presença de *Salmonella sp.* durante a criação de aves. Tanto no ambiente quanto no ceco das aves, por ação indireta, houve uma diminuição da carga do patógeno, principalmente nos estágios iniciais do ciclo de criação, possivelmente provocada pela exclusão competitiva na cama do aviário e modulação biológica da microbiota das aves em contato com o produto. Além disso, as cepas estudadas demonstraram um elevado grau de multirresistência aos antimicrobianos, principalmente para o sorovar Typhimurium e suas variantes monofásicas, que são conhecidos por sua capacidade de disseminar genes de resistência no ambiente e na cadeia avícola, podendo afetar a população. Ainda, a observação de perfis clonais idênticos ou com elevado grau de similaridade no perfil de macrorrestrição dos isolados mostrou que há uma distribuição das cepas do campo, que podem se perpetuar por toda a criação e também ao longo do tempo.

Apêndice A



Figura A. Teste confirmatório fenotípico para produção de enzimas ESBL.

Referências

- (1) USDA. United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. *Off. Glob. Anal.* **2019**, 21.
- (2) Salmonellosis (Nontyphoidal) - Chapter 4 - 2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoidal> (accessed Sep 30, 2020).
- (3) van Wangenberg, C. P. A.; Brouwer, F. M.; Hoste, R.; Rau Lei, M. L. *Comparative Analysis of EU Standards in Food Safety, Environment, Animal Welfare and Other Non-Trade Concerns with Some Selected Countries*; 2012.
- (4) Chinivasagam, H. N.; Tran, T.; Blackall, P. J. Impact of the Australian Litter Re-Use Practice on *Salmonella* in the Broiler Farming Environment. *Food Res. Int.* **2012**, 45 (2), 891–896. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.014>.
- (5) Roll, V. F. B.; Dai Prá, M. A.; Roll, A. P. Research on *Salmonella* in Broiler Litter Reused for up to 14 Consecutive Flocks. *Poult. Sci.* **2011**, 90 (10), 2257–2262. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01583>.
- (6) Assis, R. C. L.; Luns, F. D.; Cury, M. C. Desinfecção Com Amônia Quaternária Associada à Fermentação Não Potencializa o Controle de Coccidiose Em Cama de Frango. *Cienc. Rural* **2013**, 43 (8), 1459–1463. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000103>.
- (7) Roberts, B. N.; Bailey, R. H.; McLaughlin, M. R.; Miles, D. M.; Brooks, J. P. Spatial and Temporal Analysis of Microbial Populations in Production Broiler House Litter in the Southeastern United States. *J. Appl. Poult. Res.* **2013**, 22 (4), 759–770. <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00688>.
- (8) Stringfellow, K.; Caldwell, D.; Lee, J.; Byrd, A.; Carey, J.; Kessler, K.; McReynolds, J.; Bell, A.; Stipanovic, R.; Farnell, M. Pasteurization of Chicken Litter with Steam and Quicklime to Reduce *Salmonella* Typhimurium. *J. Appl. Poult. Res.* **2010**, 19 (4), 380–386. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00097>.
- (9) Larrison, E. L.; Byrd, J. A.; Davis, M. A. Effects of Litter Amendments on Broiler Growth Characteristics and *Salmonella* Colonization in the Crop and Cecum. *J. Appl. Poult. Res.* **2010**, 19 (2), 132–136. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00083>.
- (10) Roll, V. F. B.; Lopes, L. L.; Gonçalves, F. M.; Anciuti, M.; Leite, F. L.; Corrêa, E. K.; Xavier, E. G. Condição Microbiológica de Cama Tratada Com Impact P® Em Matrizes de Frangos de Corte. *Ciência Rural* **2008**, 38 (9), 2650–2653. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008005000006>.
- (11) Juricova, H.; Videnska, P.; Lukac, M.; Faldynova, M.; Babak, V.; Havlickova, H.; Sisak, F.; Rychlik, I. Influence of *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis Infection on the Development of the Cecum Microbiota in Newly Hatched Chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79 (2), 745–747. <https://doi.org/10.1128/AEM.02628-12>.
- (12) Aliakbarpour, H. R.; Chamani, M.; Rahimi, G.; Sadeghi, A. A.; Qujeq, D. The *Bacillus Subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2012**, 25 (9), 1285–1293. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12110>.
- (13) Gaylarde, C. C.; Bellinaso, M. D. L.; Manfio, G. P. Biorremediação: Aspectos Biológicos e Técnicos Da Biorremediação de Xenobióticos. *Biotechnol. Ciência e Desenvolv.* **2005**, 36–43.
- (14) Andrade, J. D. A.; Augusto, F.; Jardim, I. C. S. F. Biorremediação De Solos Contaminados Por Petróleo E Seus Derivados. *Eclética Química J.* **2018**, 35 (3), 17. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v35.3.2010.p17-43>.

- (15) Lee, K.; Lillehoj, H. S.; Siragusa, G. R. Lee, Lillehoj et Al 2010 - Direct-Fed Microbials and Their Impact. *0*.
- (16) Ahmed, S. T.; Islam, M. M.; Mun, H. S.; Sim, H. J.; Kim, Y. J.; Yang, C. J. Effects of *Bacillus Amyloliquefaciens* as a Probiotic Strain on Growth Performance, Cecal Microflora, and Fecal Noxious Gas Emissions of Broiler Chickens. *Poult. Sci.* **2014**, 93 (8), 1963–1971. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03718>.
- (17) Supriyati; Haryati, T.; Susanti, T.; Susana, I. W. R. Nutritional Value of Rice Bran Fermented by *Bacillus Amyloliquefaciens* and Humic Substances and Its Utilization as a Feed Ingredient for Broiler Chickens. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2015**, 28 (2), 231–238. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0039>.
- (18) Abriouel, H.; Franz, C. M. A. P.; Omar, N. Ben; Galvez, A. Diversity and Applications of *Bacillus* Bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, 35 (1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>.
- (19) Herzner, A. M.; Dischinger, J.; Szekat, C.; Josten, M.; Schmitz, S.; Yakéléba, A.; Reinartz, R.; Jansen, A.; Sahl, H. G.; Piel, J.; Bierbaum, G. Expression of the Lantibiotic Mersacidin in *Bacillus Amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One* **2011**, 6 (7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022389>.
- (20) ISO - ISO 6579-1:2017 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp. <https://www.iso.org/standard/56712.html> (accessed Sep 30, 2020).
- (21) ISO - ISO 7251:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* — Most probable number technique <https://www.iso.org/standard/34568.html> (accessed Sep 30, 2020).
- (22) CLSI; Dolinsky, A. L.; Ohiro, R. K.; Fan, W.; Xiao, C.; Wu, F. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100–S10. *J. Int. Med. Res.* **2017**, 46 (September), 18. <https://doi.org/10.1108/08876049410065598>.
- (23) BrCAST. Orientações Do EUCAST Para a Detecção de Mecanismos de Resistência e Resistências Específicas de Importância Clínica e / Ou Epidemiológica. **2015**, 1–39.
- (24) Ribot, E. M.; Fair, M. A.; Gautom, R.; Cameron, D. N.; Hunter, S. B.; Swaminathan, B.; Barrett, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia Coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, 3 (1), 59–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.
- (25) IBM. IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, NY 2015.
- (26) Nadell, C. D.; Drescher, K.; Foster, K. R. Spatial Structure, Cooperation and Competition in Biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, 14 (9), 589–600. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>.
- (27) Lopes, M. Avaliação de Tratamentos Químicos, Físicos e Biológicos Sobre Características de Camas Aviárias Na Produção de Frangos de Corte, Universidade Federal de Pelotas, 2017.
- (28) Menconi, A.; Morgan, M. J.; Pumford, N. R.; Hargis, B. M.; Tellez, G. Physiological Properties and *Salmonella* Growth Inhibition of Probiotic *Bacillus* Strains Isolated from Environmental and Poultry Sources. *Int. J. Bacteriol.* **2013**, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/958408>.
- (29) Cressman, M. D.; Yu, Z.; Nelson, M. C.; Moeller, S. J.; Lilburn, M. S.; Zerby, H. N. Interrelations between the Microbiotas in the Litter and in the Intestines of Commercial Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76 (19), 6572–6582. <https://doi.org/10.1128/AEM.00180-10>.

- (30) Barrow, P. A.; Lovell, M. A. Experimental Infection of Egg-Laying Hens with *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4. *Avian Pathol.* **1991**, 20 (2), 335–348. <https://doi.org/10.1080/03079459108418769>.
- (31) Hayashi, R. M.; Lourenço, M. C.; Kraieski, A. L.; Araujo, R. B.; Gonzalez-Esquerre, R.; Leonardecz, E.; da Cunha, A. F.; Carazzolle, M. F.; Monzani, P. S.; Santin, E. Effect of Feeding *Bacillus Subtilis* Spores to Broilers Challenged with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Brazilian Strain UFPR1 on Performance, Immune Response, and Gut Health. *Front. Vet. Sci.* **2018**, 5 (FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00013>.
- (32) Salminen, S. Clinical Uses of Probiotics for Stabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **1996**, 70 (2–4), 347–358. <https://doi.org/10.1007/BF00395941>.
- (33) Bugarel, M.; Granier, S. A.; Bonin, E.; Vignaud, M. L.; Roussel, S.; Fach, P.; Brisabois, A. Genetic Diversity in Monophasic (1,4,[5],12:I:- And 1,4,[5],12:-:1,2) and in Non-Motile (1,4,[5],12:-:-) Variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. *Food Res. Int.* **2012**, 45 (2), 1016–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.057>.
- (34) Echeita, M.-A.; Aladueña, A.; Cruchaga, S.; Usera, M. A. Fast-Track Communications Emergence and Spread of an Atypical *Salmonella enterica* Subsp. Enterica. *Society* **1999**, 37 (10), 3425.
- (35) Echeita, M. A.; Herrera, S.; Usera, M. A. Of Serovar 4, 5, 12 : I : X Appears To Be a Monophasic Variant of Serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol.* **2001**, 39 (8), 2981–2983. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2981>.
- (36) Opinion, S. Scientific Opinion on Monitoring and Assessment of the Public Health Risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” Strains. *EFSA J.* **2010**, 8 (10), 1–48. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1826>.
- (37) Perin, A. P. Ocorrência e Quantificação de *Salmonella* Sp. Em Cortes de Frango Congelados: Levantamento Epidemiológico No Estado Do Paraná e Perfil de Suscetibilidade a Antimicrobianos. **2017**, 103.
- (38) Velasquez, C. G.; MacKlin, K. S.; Kumar, S.; Bailey, M.; Ebner, P. E.; Oliver, H. F.; Martin-Gonzalez, F. S.; Singh, M. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* Isolated from Poultry Farms in Southeastern United States. *Poult. Sci.* **2018**, 97 (6), 2144–2152. <https://doi.org/10.3382/ps/pex449>.
- (39) Fagbamila, I. O.; Barco, L.; Mancin, M.; Kwaga, J.; Ngulukun, S. S.; Zavagnin, P.; Lettini, A. A.; Lorenzetto, M.; Abdu, P. A.; Kabir, J.; Umoh, J.; Ricci, A.; Muhammad, M. *Salmonella* Serovars and Their Distribution in Nigerian Commercial Chicken Layer Farms. *PLoS One* **2017**, 12 (3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173097>.
- (40) Vinuesa-Burgos, C.; Cevallos, M.; Ron-Garrido, L.; Bertrand, S.; De Zutter, L. Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. **2016**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>.
- (41) Voss-Rech, D.; Vaz, C. S. L.; Alves, L.; Coldebella, A.; Leao, J. A.; Rodrigues, D. P.; Back, A. A Temporal Study of *Salmonella* Enterica Serotypes from Broiler Farms in Brazil. *Poult. Sci.* **2015**, 94 (3), 433–441. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>.
- (42) Capalonga, R.; Ramos, R. C.; Both, J. M. C.; Soeiro, M. L. T.; Longaray, S. M.; Haas, S.; Tondo, E. C. *Salmonella* Serotypes, Resistance Patterns, and Food Vehicles of Salmonellosis in Southern Brazil between 2007 and 2012. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2014**, 8 (7), 811–817. <https://doi.org/10.3855/jidc.3791>.
- (43) Duarte, D. A. M.; Ribeiro, A. R.; Vasconcelos, A. M. M.; Santos, S. B.; Silva, J. V. D.; de Andrade, P. L. A.; Falcão, L. S. P. da C. de A. OCCURRENCE OF *SALMONELLA* SPP. IN BROILER CHICKEN

CARCASSES AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS Dalila. *Brazilian J. Microbiol.* **2009**, 40, 569–573.

- (44) Kanashiro, A.; Stoppa, G.; Cardoso, A.; Tessari, E.; Castro, A. Serovars of *Salmonella* Spp Isolated from Broiler Chickens and Commercial Breeders in Diverse Regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Rev. Bras. Ciência Avícola* **2005**, 7 (3), 195–198. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2005000300010>.
- (45) Rabsch, W.; Hargis, B. M.; Tsois, R. M.; Kingsley, R. A.; Hinz, K. H.; Tschäpe, H.; Bäumler, A. J. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in Poultry. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, 6 (5), 443–448. <https://doi.org/10.3201/eid0605.000501>.
- (46) Kottwitz, L. B. M.; Scheffer, M. C.; Costa, L. M. D.; Leão, J. A.; Back, A.; Dos Prazeres Rodrigues, D.; Magnani, M.; De Oliveira, T. C. R. M. Perfil de Resistência a Antimicrobianos, Fagotipagem e Caracterização Molecular de Cepas de *Salmonella* Enteritidis de Origem Avícola. *Semin. Agrar.* **2012**, 33 (2), 705–712. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p705>.
- (47) Brasil. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos Legais. Instrução Normativa N° 78, de 03 de Novembro de 2003. **2003**, 3.
- (48) Yamatogi, R. S.; Oliveira, H. C.; Possebon, F. S.; Pantoja, J. C. F.; Joaquim, J. G. F.; Pinto, J. P. A. N.; Araújo, J. P. Qualitative and Quantitative Determination and Resistance Patterns of *Salmonella* from Poultry Carcasses. *J. Food Prot.* **2016**, 79 (6), 950–955. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-489>.
- (49) Li, Y.; Cai, Y.; Tao, J.; Kang, X.; Jiao, Y.; Guo, R.; Wang, G.; Pan, Z.; Jiao, X. *Salmonella* Isolated from the Slaughterhouses and Correlation with Pork Contamination in Free Market. *Food Control* **2016**, 59, 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.040>.
- (50) Carbonera, N. R. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* Sp. ISOLADA EM LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE, 2018.
- (51) Ziech, R. E.; Lampugnani, C.; Perin, A. P.; Sereno, M. J.; Sfaiotte, R. A. P.; Viana, C.; Soares, V. M.; de Almeida Nogueira Pinto, J. P.; dos Santos Bersot, L. Multidrug Resistance and ESBL-Producing *Salmonella* Spp. Isolated from Broiler Processing Plants. *Brazilian J. Microbiol.* **2016**, 47 (1), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.021>.
- (52) Valentim, J. K.; Rodrigues, R. F. M.; Bittencourt, T. M.; Lima, H. J. D.; Resende, G. A. Implicações Sobre o Uso de Promotores de Crescimento Na Dieta de Frangos de Corte. *Rev. Eletrônica Nutr.* **2019**, 15 (4), 1–9.
- (53) Abatcha, M. G.; Effarizah, M. E.; Rusul, G. Prevalence, Antimicrobial Resistance, Resistance Genes and Class 1 Integrins of *Salmonella* Serovars in Leafy Vegetables, Chicken Carcasses and Related Processing Environments in Malaysian Fresh Food Markets. *Food Control* **2018**, 91, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.039>.
- (54) Tang, L.; Zhu, S. L.; Fang, X.; Li, Y. G.; Poppe, C.; Johnston, R. N.; Liu, G. R.; Liu, S. L. Distinct Evolutionary Origins of Common Multi-Drug Resistance Phenotypes in *Salmonella* Typhimurium DT104: A Convergent Process for Adaptation under Stress. *Mol. Genet. Genomics* **2019**, 294 (3), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01531-5>.
- (55) Zhu, Y.; Lai, H.; Zou, L.; Yin, S.; Wang, C.; Han, X.; Xia, X.; Hu, K.; He, L.; Zhou, K.; Chen, S.; Ao, X.; Liu, S. Antimicrobial Resistance and Resistance Genes in *Salmonella* Strains Isolated from Broiler Chickens along the Slaughtering Process in China. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, 259 (July), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023>.

- (56) Costa, R. G.; Festivo, M. L.; Araujo, M. S.; Reis, E. M. F.; Lázaro, N. S.; Rodrigues, D. P. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of *Salmonella* Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil. *J. Food Prot.* **2013**, *76* (12), 2011–2017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-164>.
- (57) WHO. *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: 5th Revision*; 2017.
- (58) Hur, J.; Jawale, C.; Lee, J. H. Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Food Animals: A Review. *Food Res. Int.* **2012**, *45* (2), 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>.
- (59) Vardakas, K. Z.; Tansarli, G. S.; Rafailidis, P. I.; Falagas, M. E. Carbapenems versus Alternative Antibiotics for the Treatment of Bacteraemia Due to Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum β -Lactamases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (12), 2793–2803. <https://doi.org/10.1093/jac/dks301>.
- (60) Zhanel, G. G.; Wiebe, R.; Dilay, L.; Thomson, K.; Rubinstein, E.; Hoban, D. J.; Noreddin, A. M.; Karlowsky, J. A. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs* **2007**, *67*, 1027–1052. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>.
- (61) Ammar, A. M.; Abdeen, E. E.; Abo-Shama, U. H.; Fekry, E.; Kotb Elmahallawy, E. Molecular Characterization of Virulence and Antibiotic Resistance Genes among *Salmonella* Serovars Isolated from Broilers in Egypt. *Lett. Appl. Microbiol.* **2019**, *68* (2), 188–195. <https://doi.org/10.1111/lam.13106>.
- (62) Doménech, E.; Jiménez-Belenguer, A.; Pérez, R.; Ferrús, M. A.; Escriche, I. Risk Characterization of Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Meat Products. *Food Control* **2015**, *57*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.001>.
- (63) Vinuesa-Burgos, C.; Baquero, M.; Medina, J.; De Zutter, L. Occurrence, Genotypes and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Collected from the Broiler Production Chain within an Integrated Poultry Company. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, 299 (August 2018), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.014>.
- (64) Poole, K. Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (17), 2200–2223. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>.
- (65) Palermo Neto, J.; Borsoi, A. Antibioticoterapia Em Avicultura. *Avic. Ind.* **2013**, *8* (Saúde Animal), 37–44.
- (66) Thai, T. H.; Hirai, T.; Lan, N. T.; Yamaguchi, R. Antibiotic Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Pork and Chicken Meat in North Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *156* (2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.016>.
- (67) Miranda, J. M.; Mondragon, A. C.; Martinez, B.; Guarddon, M.; Rodriguez, J. A. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. *J. Food Prot.* **2009**, *72* (5), 966–971. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.966>.
- (68) Padungtod, P.; Kaneene, J. B. *Salmonella* in Food Animals and Humans in Northern Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *108* (3), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.020>.
- (69) Yan, H.; Li, L.; Alam, M. J.; Shinoda, S.; Miyoshi, S. ichi; Shi, L. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Retail Foods in Northern China. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143* (3), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.034>.
- (70) Crump, J. A.; Sjölund-Karlsson, M.; Gordon, M. A.; Parry, C. M. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (4), 901–937.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>.

- (71) Mąka, Ł.; Maćkiw, E.; Stasiak, M.; Wołkiewicz, T.; Kowalska, J.; Postupolski, J.; Popowska, M. Ciprofloxacin and Nalidixic Acid Resistance of *Salmonella* Spp. Isolated from Retail Food in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, 276 (March), 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.012>.
- (72) Stevenson, J. E.; Gay, K.; Barrett, T. J.; Medalla, F.; Chiller, T. M.; Angulo, F. J. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi *Salmonella* Enterica Isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51 (1), 195–197. <https://doi.org/10.1128/AAC.00222-06>.
- (73) Yang, B.; Qiao, L.; Zhang, X.; Cui, Y.; Xia, X.; Cui, S.; Wang, X.; Meng, X.; Ge, W.; Shi, X.; Wang, D.; Meng, J. Serotyping, Antimicrobial Susceptibility, Pulse Field Gel Electrophoresis Analysis of *Salmonella* Isolates from Retail Foods in Henan Province, China. *Food Control* **2013**, 32 (1), 228–235.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.022>.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os moduladores vem sendo cada vez mais utilizados na avicultura, devido aos bons resultados que têm apresentado no controle de patógenos de importância na criação das aves, mas também por serem produtos seguros e não causarem prejuízos para a produção.

BAC TRAT 2A® se mostrou eficiente em ambos os estudos, tanto a campo quanto no infectório experimental, apresentando reduções nas contagens e amostras positivas de *Salmonella* na cama, foco principal do produto, possivelmente provocada pela exclusão competitiva na cama do aviário, mas principalmente no ceco das aves, demonstrando sua ação indireta, através da modulação biológica da microbiota dos animais em contato com o produto.

Além disso, no estudo a campo as cepas de *Salmonella* isoladas demonstraram um elevado grau de multirresistência aos antimicrobianos, principalmente o sorovar Typhimurium e suas variantes monofásicas, que são conhecidas por sua capacidade de disseminar genes de resistência no ambiente e na cadeia avícola. O aparecimento e disseminação de micro-organismos resistentes aos antibióticos se torna um grande problema para a saúde pública, visto que os genes de resistência a antimicrobianos incorporados nestas populações bacterianas ameaçam a eficácia de drogas utilizadas para tratar infecções em seres humanos causadas por estes patógenos.

Embora os benefícios da utilização do modulador biológico tenham sido comprovados em ambos os estudos, são necessárias mais pesquisas com o uso do produto na cama, visto que a maioria dos estudos fazem a utilização destes produtos por via oral.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Science**, v.370, 2015.
- ABATCHA, M. G.; EFFARIZAH, M. E.; RUSUL, G. Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of *Salmonella* serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. **Food Control**, v. 91, p. 170–180, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.039>>.
- ABD-ELGHANY, S. M.; SALLAM, K. I.; ABD-ELKHALEK, A.; TAMURA, T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 143, n. 5, p. 997-1003, 2015. DOI: 10.1017/S0950268814001708.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.; NABIL, O.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. **FEMS Microbiology Review**, v. 35, p. 201-232, 2011.
- AHMED, S. T.; ISLAM, M.; MUN, H. S.; SIM, H. J.; KIM, Y.; YANG, C. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-1971, 2014.
- ALIAKBARPOUR, H. R.; CHAMANI, M.; RAHIMI, G.; SADEGHI, A. A.; QUJIEQ, D. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 25 p. 1285-1293, 2012.
- AMMAR, A. M.; ABDEEN, E. E.; ABO-SHAMA, U. H.; FEKRY, E.; KOTB ELMAHALLAWY, E. Molecular characterization of virulence and antibiotic resistance genes among *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 188–195, 2019.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO F. e JARDIM, I. F. Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Campinas, v.35, n. 3, p.17-43, 2010.
- ANJUM, M. F.; CHOUDHARY, S.; MORRISON, V.; SNOW, L. C.; MAFURA, M.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. and WOODWARD, M. J. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n.3, p. 550-559, 2011.
- ANTUNES, P.; MOURAO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência microbiana – Mecanismos e impacto clínico**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/pas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 21 de junho de 2019.

ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. D.; CURY, M. C. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 8, p. 1459–1463, 2013.

ARASHIRO, O. **A história da avicultura do Brasil**. São Paulo: Ed. Gessulli, 1989.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Avian Pathology**, v. 20, n. 2, p. 335–348, 1991.

BELUSSO D. e HESPAANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus Efeitos territoriais. **Revista Percursos**. Maringá, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BERGER, H.W. and PARKER F.L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. **Science**, v. 168, p. 1345-1347, 1970.
doi:10.1126/science.168.3937.1345

BERSOT, L.D.S.; VIANA, C.; SERENO, M. J.; PERIN, A.P.; BARCELLOS, V.C. Occurrence of *Salmonella* sp. in poultry carcasses evaluated from the retail trade between 2007 and 2013 in Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.56, n. 2, 2019.
<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.150446>

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, p.63-67, 2000.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003, **Diário Oficial da União**, p. 3, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium, em anexo. **Diário Oficial da União**, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no serviço de inspeção federal (SIF). **Diário Oficial da União**, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 210-Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienico-sanitária de Carne de Aves**. Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico Sobre as Condições Higienico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. 1997. Portaria nº 368 de 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Informe 2018**. 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta--o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.
BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Efeito da utilização de Impact – P® na ocorrência de celulite em frangos de corte. **Hora Veterinária**, v. 26, p.13-20, 2007.

BRCAS. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e / ou epidemiológica. , p. 1–39, 2015.

BROOKS, J.P. Spatial and temporal analysis of microbial populations in production broiler house litter in the southeastern United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 759-770, 2013.

BROUCEK, J.; CERMAK, B. Emission of harmful gases from poultry farms and possibilities of their reduction. **Ekologia**, v. 34, p.89–100, 2015.

BUGAREL, M.; GRANIER, S. A.; BONIN, E.; et al. Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 1016–1024, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.057>>.

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, n.8, p. 1891-1897, 2006.

CAPALONGA, R.; RAMOS, R. C.; BOTH, J. M. C.; et al. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 811–817, 2014.

CARBONERA, N. R. **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* sp. ISOLADA EM LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE**, 2018

CARDOSO, A.; KANASHIRO, A.; STOPPA, G.; CASTRO, A.; LUCIANO, R. e TESSARI, E. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.24, p.1-12, 2015.

CARTER, A.J.; ADAMS, M.R.; WOODWARD, M.J.; LA RAGIONE, R.M. Control strategies for *Salmonella* colonization of poultry: the probiotic perspective. **Food Science and Technology**, v.5, p.103–15, 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: enteric bacteria 2012 Human isolates final report, 2014. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/narms/pdf/2012-annual-report-narms-508c.pdf> >. Acesso em: 27 de junho de 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***Salmonella* and Food**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/salmonella-food/index.html>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M. and HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? **Evolutionary Applications**, v.8, n. 3, p. 240–247, 2015.

CHEN, H.M.; WANG, Y.; SU, L.H.; CHIU, C.H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, p. 147-152, 2013.

CHEN, Z.; WANG, H.; JIANG, X. Developing a two-step heat treatment for inactivating desiccation adapted *Salmonella* spp. in aged chicken litter. **Foodborne Pathogens Disease**, v 12, p.104–109, 2015.

CHINIVASAGAM, H. N.; REDDING, M.; RUNGE, G.; BLACKALL, P. J. Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. **British Poultry Science**, v. 51, p. 311-318, 2010.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. Summary of National Reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of food protection**, Ames, v. 69, n. 5, p.1150-53, 2006. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715818.

CLSI; DOLINSKY, A. L.; OHIRO, R. K.; et al. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. September, p. 18, 2017. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nerlcwww/1604sp02.pdf>><<http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>><https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf><http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S27_sample.pdf>.

COLLETT, Stephen. Nutrition and wet litter problems in poultry. **Animal Feed Science Technology**, v.173, p.65–75, 2012.

Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Documentos**, v.149, p. 125-152, 2011.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; WILSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA-RAY, P.J. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: a review. **J Appl Poultry Research**, v. 24, p.408-426, 2015.

COSTA, R. G.; FESTIVO, M. L.; ARAUJO, M. S.; et al. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2011–2017, 2013.

CRESSMAN, M. D.; YU, Z.; NELSON, M. C.; et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572–6582, 2010.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A.; GARCIA-PEÑA, J.; FRIAS, N.; USERA, M.A. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Disease**, v. 47, p. 315-321, 2001.

CRUMP, J. A.; SJÖLUND-KARLSSON, M.; GORDON, M. A.; PARRY, C. M. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 901–937, 2015.

CRUZ, D. P.; OTUTUMI, L. K.; JUNIOR, R. P.; CERVANTES, R. P.; MEZALIRA, T. S.; GERÔNIMO, E. Performance, carcass yield and litter quality of broilers raised on litters treated with microorganisms. **Ciência animal Brasileira**, v. 14, p.41-48, 2013.

CUI, M.; XIE, M.; QU, Z.; ZHAO, S.; WANG, J.; WANG, Y.; HE, T.; WANG, H.; ZUO, Z.; WU, C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China. **Food Control** v. 62, p. 270–276, 2016.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. 5. ed. Blucher, 2017. 535 p.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239–241, 1965.

DAVIES, M. E; PARROT, T.; BROWN, D.C.; RODAS, B.Z.D.; JOHNWON, Z.B.; MAXWELL, C.V.; REHBERHER, T. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 6, p.1459-1467, 2008.

DECLOUR, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **National Institutes of Health**, v. 1749, n. 5, p. 808-816, 2009.

DIAS, M.R.; CAVICCHIOLI, V.Q.; CAMARGO, A.C.; LANNA, F.G.P.A.; PINTO, P.S. de A.; BERSOT, L.D.S.; NERO, L.A. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1084–1091, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2126-3>.

DOMÉNECH, E.; JIMÉNEZ-BELENGUER, A.; PÉREZ, R.; FERRÚS, M. A.; ESCRICHE, I. Risk characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat products. **Food Control**, v. 57, p. 18–23, 2015.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p. 569-573, 2009.

DUMAS, M. D.; POLSON, S. W.; RITTER, D.; RAVEL, J.; GELB, J.; WOMMAC, K. E. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

ECHEITA, M.-A.; ALADUEÑA, A.; CRUCHAGA, S.; USERA, M. A. Fast-Track Communications Emergence and Spread of an Atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Society**, v. 37, n. 10, p. 3425, 1999.

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; USERA, M. A. of Serovar 4 , 5 , 12 : i : χ Appears To Be a Monophasic Variant of Serovar Typhimurium. **J Clin Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2981–2983, 2001.

EFSA. European Food Safety Authority. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. 2015. Disponível em: <
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2015.4036>>. Acesso em: 27 de junho de 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v. 16, n. 12, p. 5500, 2018.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Salmonella* [Online]**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016a.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – *Salmonella* nomenclature [Online]**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016b.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Approved lists of Bacterial Names [Online]**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/salmonella.html>. Acesso em: 23 de junho de 2019. 2016c.

FAGBAMILA, I. O.; BARCO, L.; MANCIN, M.; et al. *Salmonella* serovars and their distribution in Nigerian commercial chicken layer farms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 789–794, 2012.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p.4273–4279, 2011.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.D.L.; MANFILO, G.P. - Biorremediação - aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos; **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GONG, J.; ZHANG, J.; XU, M.; ZHU, C.; YU, Y.; LIU, X.; KELLY, P.; XU, B.; WANG, C. Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry *Salmonella*

isolates in China (2006 to 2012). **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, p. 687–693. 2014.

GRIMONT, P.A.D and WEILL, F.-X., **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, Institut Pasteur, Paris, 2007. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_En.pdf>. Acesso em: 24 de junho de 2019.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). ***Salmonella in domestic animals***. New York: CABI Publishing, cap.1, p.1-17, 2000.

HARRINGTON, D.; SIMS, M.; KEHLET, A.B. Effect of *Bacillus subtilis* supplementation in low energy diets on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 25, n. 1, p. 29-39, 2015.

HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; KRAIESKI, A.L.; ARAUJO, R.B.; GONZALEZ-ESQUERRA, R.; LEONARDECZ, E.; DA CUNHA, A.F.; CARAZZOLLE, M.F.; MONZANI, P.S.; SANTIN, E. Effect of feeding *Bacillus subtilis* spores to broilers challenged with *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Brazilian Strain UFPR1 on performance, immune response, and gut health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 13, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00013>

HE, L.; LILI, W.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**, v. 161 p. 321-326, 2006.

HERZNER, A. M.; DISCHINGER, J.; SZEKAT, C.; et al. Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2011.

HILAL-DANDAN, R. and BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2008.

HONG, H. A.; HONG DUC, L.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.

HOSSAIN, M.M.; BEGUM, M.; KIM, I.-S. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. **Veterinární Medicína**, v. 60, p.77- 86, 2015.
<https://doi.org/10.4148/2378-5977.7123>

HUNTER, J.C. and FRANCOIS WATKINS, L.K. **Salmonellosis (nontyphoidal) in CDC Yellow Book 2018: Health information for international Travel**. 2018. Disponível em:

<<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/salmonellosis-nontyphoidal>>. Acesso em 9 de outubro de 2018.

HUR, J.; JAWALE, C. and LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v.45, p. 819–830, 2012.

IBM Corp. Lançado em 2015. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579-1:2017 - Microbiology of food chain and animal feeding stuffs: Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.** Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/56712.html>>. Acesso em: 30/9/2020.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/TS 6579-2:2002 (E): horizontal method for the enumeration of *Salmonella* by a miniaturized MPN technique.** Geneva: ISO (2002).

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 7251:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* — Most probable number technique.** Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/34568.html>>. Acesso em: 30/9/2020.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGETIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I. and WEILL, F.X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, n.7, p. 526-530. 2014. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>> <PMid:25049166>.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAE, M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; HAVLICKOVA, H.; SISA, F.; RYCHLIK, I. Influence of *Salmonella* enteric Serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p. 745-747, 2012.

KANASHIRO, A.; STOPPA, G.; CARDOSO, A.; TESSARI, E.; CASTRO, A. Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 3, p. 195–198, 2005.

KIM, S.; KANG, H.-W.; WOO, G.-J. Prevalence of CTX-M-15 extended-Spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* isolated from chicken in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 661–663, 2015. <<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1911>>.

KNAP, I.; KEHLET, A.B.; BENNEDSEN, M.; MATHIS, G.F.; HOFACRE, C.L.; LUMPKINS, B.S.; JENSEN, M.M.; RAUN, M.; and LAY, A. *Bacillus subtilis* (DSM 17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1690-1694, 2011. doi:10.3382/ps.2010-01056.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315–317, 1983.

KOTTWITZ, L. B. M.; SCHEFFER, M. C.; COSTA, L. M. D.; et al. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 705–712, 2012.

LARRISON, E. L.; BYRD, J. A.; DAVIS, M. A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p.132-136, 2010.

LAXMINARAYAN, L.; SRIDHAR, D.; BLASER, M.; WANG, M.; WOOLHOUSE, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, v.353, n. 6302, p. 874-875, 2016.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 47, p. 106-114, 2010. doi:10.2141/jpsa.009096

LETTINI, A. A.; VO THAN, T.; MARAFIN, E.; LONGO, A.; ANTONELLO, K.; ZAVAGNIN, P.; BARCO, L.; MANCIN, M.; CIBIN, V.; MORINI, M.; DANG THI SAO, M.; NGUYEN THI, T.; PHAM TRUNG, H.; LE L, NGUYEN DUC, T.; RICCI, A. . Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility from poultry and swine farms in central Vietnam. **Zoonoses and Public Health**, v.63, n.7, p. 569-576, 2016.

LI, R.; LAI, J.; WANG, Y.; LIU, S.; LI, Y.; LIU, K.; SHEN, J.; WU, C. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 14–18, 2013.

LI, Y.; CAI, Y.; TAO, J.; et al. *Salmonella* isolated from the slaughterhouses and correlation with pork contamination in free market. **Food Control**, v. 59, p. 591–600, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.040>>.

LINDBERG, A.A. and LE MINOR, L. Serology of *Salmonella*. **Methods in Microbiology**, v.15, p.1-64,1984.

LOPES ASSIS, R.C.; DIAS LUNS, F. E.; CURY, M.C. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 43, n.8, p. 1459-1463, 2013.

LOPES, M.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. L. et al. Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. **Poultry Science**, v. 92, p.638-644, 2013.

LOPES, MICHELLE. Avaliação de tratamentos químicos, físicos e biológico sobre características de camas aviárias na produção de frangos de corte. **Dissertação**. Pelotas. 2017

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F., "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis". **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 882-889, 2010.

MAŁKA, Ł.; MAĆKIW, E.; STASIAK, M.; et al. Ciprofloxacin and nalidixic acid resistance of *Salmonella* spp. isolated from retail food in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, n. March, p. 1–4, 2018.

MALAVAZZI, G. **Avicultura: Manual Prático**. São Paulo: Nobel, 1977.

MARSHALL, B. M., and LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 718–733, 2011.

MAURISCHAT, S.; ROSSOW, M.; ELLERBROEK, L.; PICHNER, R.; MALORNY, B. *Salmonella* spp. prevalence and contamination risk factors in broiler and broiler meat of *Gallus gallus* in Germany and the European Union. Berl. Munch. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** v. 128, p. 3–13. 2014. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-03>.

MEHTA, H.H.; PRATER, A.G.; SHAMOO, Y. Using experimental evolution to identify druggable targets that could inhibit the evolution of antimicrobial resistance. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, p.279-286, 2018.

MENCONI, A.; MORGAN, M.J.; PUMFORD, N.R.; HARGIS, B.M. and TELLEZ, G. Physiological properties and *Salmonella* growth inhibition of probiotic *Bacillus* strains isolated from environmental and poultry sources. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/958408>

MEURER, R. F. P.; LEAL, P. C.; ROCHA, C. DA; BUENO, I. J. M.; MAIORKA, A. DAHLKE, F. Evaluation of the use of probiotics in diets with or without growth promoters for broiler chicks. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 12, p. 2687-2690, 2010.

MIRANDA, J. M.; MONDRAGON, A. C.; MARTINEZ, B.; GUARDDON, M.; RODRIGUEZ, J. A. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 966–971, 2009.

NADELL, C. D.; KNUT, D.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 589-600, 2016.

NATARO, J.; BOPP, C.; FIELDS, P.; KAPER, J.; STROCKBINE, N. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.; LANDRY, M.; WARNOCK, D. **Manual of Clinical Microbiology**. 10th. Washington, DC., USA: ASM Press, p. 603–626, 2011.

NAWAZ, M. S.; ERICKSON, B. D.; KHAN, A. A.; KHAN, S. A.; POTHULURI, J. V.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; WAGNER, R. D.; CERNIGLIA, C. E. Human Health Impact and Regulatory Issues Involving Antimicrobial Resistance in the Food Animal Production Environment. **Regulatory Research Perspectives**, v.1, p.1-10, 2001.

NGUYEN, D. T. A.; KANKI, M.; NGUYEN, P. D.; LE, H. T.; NGO, P. T.; TRAN, D. N. M.; LE, N.H.; VAN DANG, C.; KAWAI, T. and KAWAHARA, R. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC β -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 115-122, 2016.

NISHINO, K.; NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 834–843, 2009.

NITIKANCHANA, S.; TOKACH, M.D.; DEROUCHÉY, J. M.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J. L.; and DRITZ, S.S. The Effect of *Bacillus* Probiotic on Growth Performance and Fecal Consistency of Growing-Finishing Pigs. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**: Vol. 0: Iss. 10, 2011.

OH, J.K.; PAJARILLO, E.A.B.; CHAE, J.P.; KIM, I.H.; YANG, D.S.; KANG, D.-K. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella* Gallinarum. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, 2017.

OLIVEIRA, D.R.M.S. and NÄÄS, I.A. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ADVANCES IN PRODUCTION MANAGEMENT SYSTEMS, 2012, Rhodes. **Anais...Competitive Manufacturing for Innovative Products and Services: proceedings**, Greece: International Federation for Information Processing, 2012.

OPINION, S. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. **EFSA Journal**, v. 8, n. 10, p. 1–48, 2010.

OUESLATI, W.; RJEIBI, M. R.; MHADHBI, M.; JBELI, M.; ZRELLI, S. and ETTRIQUI, A. Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). **Meat Science**, v.119, p. 154-159, 2016.

PADUNGTOOD, P.; KANEENE, J. B. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3,

p. 346–354, 2006.

PALERMO NETO, J.; BORSOI, A. Antibioticoterapia em Avicultura. **Avicultura Industrial**, v. 8, n. Saúde Animal, p. 37–44, 2013.

PALHARES, J. C. P.; KUNZ, A. (Ed.). Manejo ambiental na avicultura, 2011. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Documentos**, p. 125-152, 2011.

PALMEIRA, A.; SANTOS, L. R.; BORSOI, A.; RODRIGUES, L. B.; CALASANS, M.; NASCIMENTO, V. P. Serovars and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. isolated from Turkey and Broiler Carcasses in Southern Brazil Between 2004 and 2006. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 19, p. 1-5, 2016.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, p. 108–119, 2014.

PARRY, C.M.; THRELFALL E.J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 531-538, 2008.

PEELER, J.T.; MCCLURE, F.D. Appendix 2. Most Probable Number Determination. In: **Bacteriological Analytical Manual**, GARTHRIGHT, W.E. 7th ed., Appendix 2, FDA, Washington D.C. 1992.
PHAC. 2014. Annual summary 2012. National Enteric Surveillance Program. Public Health Agency of Canada.

PERIN, A. P. Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. , p. 103, 2017.

POOLE, K. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2200–2223, 2004.

POPOFF, M.Y. and LE MINOR, L.E. Genus XXXIII *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R. and STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Ed. Volume 2. New York: Springer Science+Business. Media Inc. p. 764-799, 2005.

RABSCH, W.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M.; et al. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 443–448, 2000.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. 2014 annual report. **European Commission-Health and Food Safety**. 2015. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2014.pdf>. Acesso em 31 de janeiro de 2017.

REN, D.Y.; LI, C.; QIN, Y.Q.; YIN, R.L.; DU, S.W.; YE, F.; LIU, H.F.; WANG, M.P.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M. Y.; JIN, N.Y. Lactobacilli reduce chemokine IL-8

production in response to TNF- α and *Salmonella* challenge of Caco-2 cells. **Biomed Research International**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/925219

REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q.; MINAFRA, C.S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobiano. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.100, n.555-556, p.199-203, 2005.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RICE, L. and BONOMO, R. (2005). **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial**. Em Victor Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine (5^a ed., pp. 441-476). Nova Iorque.

RICK, P.D. Lipopolysaccharide biosynthesis. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology**. Washington D.C., USA, p. 648-662, 1987.

ROBERTS, B. N.; BAILEY, R. H.; MCLAUGHLIN, M. R.; MILES, D. M.; RODRIGUEZ-RIVERA, L. D.; CUMMINGS, K. J.; LONERAGAN, G. H.; RANKIN, S. C.; HANSON, D. L.; LEONE, W. M.; EDRINGTON, T.S. *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility among dairy farm environmental samples collected in Texas. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.13, n. 4, p. 205-211, 2016.

ROLL, V. F. B.; DAI PRÁ, M. A.; ROLL, A. P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, p. 2257–2262, 2011.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M.; ANCIUTI, M.; LEITE, F. L.; CORRÊA, E. K.; XAVIER, E. G. X. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2650-2653, 2008.

RYAN, M. P.; O'DWYER, J. and ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed research international**, v. 2017. 2017. doi: 10.1155/2017/37821827

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges.

Antonie Van Leeuwenhoek, v. 70, p. 347–358, 1996.
doi:10.1007/BF00395941

Salmonellosis (Nontyphoidal) - Chapter 4 - 2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC. Disponível em:
<<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>>. Acesso em: 30/9/2020.

SALMONELLA SUBCOMMITTEE OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (1934). The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. **The Journal of hygiene**, 34(3), 333–350. doi:10.1017/s0022172400034677

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A.; FERNANDAS, S. A.; TAVECHIO, A. T.; DO AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39–42, 2000.

SCHMIDT, N.S.; SILVA, C.L.D. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467- 482, 2018.

SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, v.71, p.2125–8, 1992.

SEN, S.; INGALE, S.L.; KIM, Y.-W.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; LOHAKARE, J.; KIM, E.K.; KIM, H.S.; RYU, M.H.; KWON, I.K.; CHAE, B.J. (2011). Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1–2 to broiler diet on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in veterinary science**, v. 93, p. 264-268.

SHAH, A. H. and KOREJO, N.A. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat. **Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 2, p. 40–46, 2012.

SHEPHERD, E. M.; FAIRCHILD, B. D. Footpad dermatitis in poultry - a review. **Poultry Science**, v, 89, p. 2043–2051, 2010.

SHIVARAMAIAH, S.; PUMFORD, N.R.; MORGAN, M.J.; WOLFENDEN, R.E.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HARGIS, B.M.; TÉLLEZ, G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. **Poultry Science**, v. 90, p. 1574-1580, 2011. doi:10.3382/ps.2010-00745

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. **Mapa da Avicultura: Paraná, o Comandante Brasileiro. 2020**. Disponível em: <<https://sindiavipar.com.br/mapa-da-avicultura/>>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

SOMMER, M.O.A; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R.V.; ANDERSSON, D.I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p. 689-696, 2017.

STEVENSON, J. E.; GAY, K.; BARRETT, T. J.; et al. Increase in nalidixic acid resistance among non-typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 195–197, 2007.

STRINGFELLOW, K.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, A.; CAREY, J.; KESSLER, K.; MCREYNOLDS, J.; BELL, A.; STIPANOVIC, J.; FARNELL, M. Pasteurization of chicken litter with steam and quicklime to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 380-386, 2010.

SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T.; SUSANA, I.W.R. Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingrediente for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 28, n. 2, p. 231-238, 2015.

TANG, L.; ZHU, S. L.; FANG, X.; et al. Distinct evolutionary origins of common multi-drug resistance phenotypes in *Salmonella* typhimurium DT104: a convergent process for adaptation under stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 294, n. 3, p. 597–605, 2019. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00438-019-01531-5>>. .

TAVARES, L. P.; RIBEIRO, K. C. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v.9, n. 1, p. 79-88, 2007.

TENOVER, F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American **Journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S9, 2006.

THAI, T. H.; HIRAI, T.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 147–151, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.016>>. .

THAMES, C. H.; PRUDEN, A.; JAMES, R. E.; RAY, P. P. and KNOWLTON, K. F. Excretion of antibiotic resistance genes by dairy calves fed milk replacers with varying doses of antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.139, 2012.

THUNG, T.Y.; MAHYUDIN, N.A.; BASRI, D.F.; WAN MOHAMED RADZI, C.W.J.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1888-1893, 2016. <https://doi.org/10.3382/ps/pew144>.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. and CASE, C.L. - **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre, Artmed, p. 934, 2012.

TUYTTENS, F.; VANHONACKERW, F.; VERBEKE, W. Broiler production in Flanders, Belgium: Current situation and producers' opinions about animal welfare. **World's Poultry Science Journal**, v, 70, p.343– 354, 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: World Markets and Trade. **Office of Global Analysis**, p. 21, 2019. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2019.

USDA/FSIS. FSIS Directive. **Salmonella and Campylobacter verification program for raw meat and poultry products**. 2013.

VALENTIM, J. K.; RODRIGUES, R. F. M.; BITTENCOURT, T. M.; LIMA, H. J. D.; RESENDE, G. A. Implicações sobre o uso de promotores de crescimento na dieta de frangos de corte. **Revista Eletrônica NutriTime**, v. 15, n. 4, p. 1–9, 2019.

VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E.E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.P.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, S. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1350–1352, 2017.

VAN WANGENBERG, C. P. A.; BROUWER, F. M.; HOSTE, R.; RAU LEI, M. L. **Comparative analysis of EU Standards in food safety, environment, animal welfare and other non-trade concerns with some selected countries**. 2012.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THÉWIS, A. *Salmonella* in Chicken: Current and Developing Strategies to Reduce Contamination at Farm Level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774–785, 2010.

VARDAKAS, K. Z.; TANSARLI, G. S.; RAFAILIDIS, P. I.; FALAGAS, M. E. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2793–2803, 2012.

VELASQUEZ, C. G.; MACKLIN, K. S.; KUMAR, S.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry farms in southeastern United States. **Poultry Science**, v. 97, n. 6, p. 2144–2152, 2018.

VINUEZA-BURGOS, C.; BAQUERO, M.; MEDINA, J.; DE ZUTTER, L. Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from the broiler production chain within an integrated poultry company. **International Journal of Food Microbiology**, v. 299, n. August 2018, p. 1–7, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.014>>.

VINUEZA-BURGOS, C. V. ***Salmonella* and *Campylobacter* in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador.** Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium, 2017.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P. & BACK, A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, p. 433-441, 2015. DOI:10.3382/ps/peu081

WANG, Y.; CHO, J.H.; CHEN, Y.J.; YOO, J.S.; HUANG, Y.; KIM, H.J.; KIM, I.H. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. **Livestock Science**, v. 120, p. 35-42, 2009.

WANGEN, D.R.B.; PENA, P. R. A.; CAMARGO, A.P.F.; SANTOS, M. S.; PIRES, M. R. Emprego de inoculante à base de micro-organismos na compostagem de cama de aviário, **Enciclopédia biosfera**, v. 9, p. 1268, 2013.

WERLE, G.; LOVATO, M.; WILSMANN, C. G.; GAZONI, F. G.; CHAVES, B. W.; BRUSTOLIN, J. M. Avaliação microbiológica da cama de frangos de corte tratada com Ecodryaves. **Anais... 25ª Jornada Acadêmica Integrada.UFSM**, 2010.

WHO. World Health Organization. **Critically important antimicrobials for human medicine: 5th revision**, 2017.

WILKINSON, K. G.; TEE, E.; TOMKINS, R. B.; HEPWORTH, G.; PREMIER, R. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. **Poultry Science**, v. 90, p. 10–18, 2011.

YAMATOOGI, R. S.; OLIVEIRA, H. C.; POSSEBON, F. S.; et al. Qualitative and quantitative determination and resistance patterns of *Salmonella* from poultry carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 6, p. 950–955, 2016.

YAN, H.; LI, L.; ALAM, M. J.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 230–234, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.034>>. .

YANG, B.; QIAO, L.; ZHANG, X.; et al. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 228–235, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.022>>.

YILDIRIM, Y.; GONULALAN, Z.; PAMUK, S. and ERTAS, N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. **Food Research International**, v.44, p. 725-728, 2011.

ZIECH, R. E.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; et al. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 191–195, 2016.

ZHANEL, G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; et al. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, p. 1027–1052, 2007.

ZHU, Y.; LAI, H.; ZOU, L.; et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, n. July, p. 43–51, 2017.